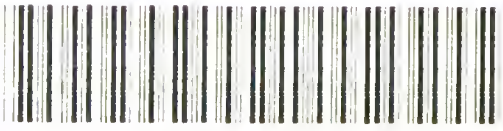
(THE MOST USEFUL BOOK)

TASCHENBUCH
DER MIKROSKOPISCHEN TECHNIK
DER PROTISTENUNTERSUCHUNG

VON DR. S. v. PROWAZEK

ZWEITE AUFLAGE


22102062012

Med
K16469

M. H. Gordon

This is a very Valuable little book MHG.

my notes on Spirochaete Staining P.48–49.

X and on "Strongyloplasma" or Elementary Body Staining

My Expts re Influenza Elementary Bodies in Nasal Secn Staining Expts 1922

P.34 (opp. page)
P.46 (do)
P.84 (do)

Inclusion bodies Staining P.78
(my note re HD do.)

Verlag von Johann Ambrosius Barth in Leipzig.

Wer eine etwas ausführlichere Darstellung wünscht, dem seien nachstehende

Medizinische Lehrbücher

angelegentlich empfohlen:

Allgemeine Chirurgie von Dr. A. Krüche. Achte Auflage. 1907. Mit 32 Abbildungen. geb. M. 6.75

Spezielle Chirurgie von Dr. A. Krüche. Zwölfte Auflage. 1909. Mit 50 Abbildungen. geb. M. 6 75

Differential-Diagnostik der inneren Krankheiten von Dr. Georg Kühnemann. 2. umgearb. Aufl. 1908. geb. M. 5.—

Elektrotherapie von Dr. R. H. Pierson und Dr. A. Sperling. Sechste Auflage. 1893. Mit 87 Abb. geb. M. 6.75

Geburtshilfliche Diätetik und Therapie v. Prof. Dr. L. Knapp. 1902. Mit 147 Abb. geb. M 8.40

Geburtshilfliche Propädeutik von Prof. Dr. L. Knapp. Mit Vorwort von Prof. Dr. v. Rost horn. 1899. Mit 100 Abb. geb. M. 5.40

Geisteskrankheiten Diagnostik und Prognostik der, von Dr. M. Fuhrmann. Mit 13 Kurven und 19 Schriftproben. 1903. geb. M. 5.75

Gerichtliche Medizin von Dr. P. Guder. 2. Auflage von Dr. P. Stolper. 1900. geb. M. 6 75

Hydrotherapie von Dr F. C. Müller. 1890. X und 568 Seiten mit 27 Abbildungen. geb. M. 6.75

Hypnotismus und Suggestivtherapie v. Dr. L. Hirschlaff. 2. Aufl. 1905. geb. M. 4.50

Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie von Prof. Dr. A. Diendonné. 6. Aufl 1909. M. 6.80, geb. M. 7.80

Kinderheilkunde von Prof. Dr. O. Heubner. 2 Bde. 2. Aufl. 1906. Mit 77 Abb. u. 1 Tafel. M. 31.—, geb. M. 36.—

Lokalanaesthesie, ihre wissenschaftl. Grundlagen und praktische Anwendung v. Prof. Dr. H. Braun 2. Auflage. Mit 127 Abbildungen. 1907. M. 10.—, geb. M. 11.—

Medizinische Physik von Prof. Dr H. Borruttau. 1908. Mit 127 Abbildungen. M. 8.—, geb. M. 9.—

Nervenkrankheiten von Dr. P. J. Möbius. 1893. VIII und 188 Seiten geb. M. 4.50

Organische Chemie für Mediziner, von Professor G. v. Bunge. 1906. M. 7.—, geb. M. 8.25

Physik von Prof. Dr. E v. Lommel 14—16. Aufl. von Prof. Dr. W. König. Mit 438 Abbildungen und 1 Spektraltafel. 1908. M. 6.40, geb. M. 7.20

Physiologische Chemie von Dr. Arthus und Dr. Starke. 2. Auflage. 1904. geb M. 6.—

Psychiatrie von Prof. Dr. E. Kraepelin. 2 Bde. I. Bd: 8. Aufl. Mit 38 Abb u. 1 Tafel. 1909. M. 18.50, geb. M. 20.— II. Bd.: 7. Aufl Mit 53 Abb. u. 7 Tafeln. M. 23.—, geb. M. 24.—

Psychiatrische Klinik, Einführung in die, 2. durchgearb. Aufl. 1905. M 9.—, geb. M. 10.—

Zahnheilkunde von Jul. Parreidt. Dritte Auflage. 1900. VIII und 344 Seiten mit 80 Abbildungen. geb. M. 6.75

M H Gordon

Taschenbuch

der mikroskopischen Technik

der

Protistenuntersuchung

von

Dr. S. von Prowazek.

Zweite umgearbeitete Auflage.

Leipzig
Verlag von Johann Ambrosius Barth
1909.

Vorwort zur 2. Auflage.

Das große Interesse, das in der letzten Zeit der Protozoenkunde entgegengebracht wird, sowie die reichhaltigen Ergebnisse der modernen Protistologie, mit denen in gleicher Weise nicht unerhebliche Fortschritte in der mikroskopischen Technik zu verzeichnen waren, machten die Herausgabe einer zweiten Auflage des vorliegenden Taschenbuches zu einer Notwendigkeit. In erster Linie bringt die neue Auflage zahlreiche Ergänzungen zu der Methodik der Protozoenuntersuchungen, gleichzeitig wurden einige bereits überwundene technische Anweisungen weggelassen. Die Mehrzahl der angeführten Methoden wurde geprüft — sie sind ohne Mühe durchführbar, dagegen wurden komplizierte Methoden, die selbst zu keinem erheblichen Ergebnisse führen, nicht angeführt. Da das Büchlein praktischen Zwecken in erster Linie dienen soll, wurde das alte bekannte Protozoensystem noch beibehalten.

Hamburg, im Juli 1909.

Der Verfasser.

Inhalt.

Seite

Vorwort zur 1. Auflage 3
„ „ 2. „ 4
Die mikroskopische Untersuchung im allgemeinen 7
Sogenannte Vitalfarbstoffe 13
Darstellung der Kernsubstanzen 18
I. Stamm. Cytomorpha 20
I. Klasse. Rhizopoda 20
1. Ordnung. Amöbina 20
Dysenterieamöben. 26
2. Ordnung. Foraminifera 28
3. Ordnung. Radiolaria 29
II. Klasse. Mastigophora 30
Flagellaten im weitesten Sinne des Wortes 30
Trypanosomen 32
Kultur der Trypanosomen 36
Anhang: Spirochäten 38
Treponema pallidum. („Syphilisspirochäta“) 43
III. Klasse. Sporozoa 50
1. Ordnung. Hämosporidia 50
Malaria 50
Unterordnung. Piroplasmen . . . 59
„ Kala-azar 60
2. Ordnung. Koccidien 61
3. Ordnung. Gregarinen 63
4. Ordnung. Myxosporidien 65
5. Ordnung. Sarkosporidien 68
II. Stamm. Cytoidea 69
Klasse Ciliata 69
Anhang: Chlamydozoa 76
Register 86

Digitized by the Internet Archive
in 2016

https://archive.org/details/b28081845

Die mikroskopische Untersuchung im allgemeinen.

Bei der Untersuchung der Protozoen kommt es nicht so sehr auf eine Anwendung von komplizierten Färbe- und Untersuchungsmethoden als auf eine zweckmäßige Ausnutzung der optischen Instrumente (Irisblende, Kondensor usw.) an. In erster Linie muß man stets sehr eingehend das lebende Objekt untersuchen. Erst, wenn dieses nach allen Richtungen hin geschehen ist, möge man an die Betrachtung des toten, gefärbten Objektes herantreten.

Für die Untersuchung empfiehlt sich die Anschaffung eines Mikroskopes (großes Stativ) von Zeiß mit den Apochromaten 2 mm (Apert. 1,30) homog. Immersion, Apochromat 3 mm (Apert. 0,95), Apochromat 8 mm (Apert. 0,65), Apochromat 16 mm (Apert. 0,30 und mit den Kompensationsokularen 4, 6, 8, 12, 18.

Als Objektive sind für die Betrachtung der Protozoenpräparate zunächst in der Mehrzahl der Fälle das schwache Objektiv Apochromat 8 mm, dann das Immersionsobjektiv 2 mm (homog. Immersion) von besonderer Wichtigkeit. Gute Dienste leistet aber auch das mit einer Deckglaskorrektur versehene, starke Trockensystem Apochromat 3 mm (Apert. 0,95). Kleine Objekte sucht man am bequemsten zuerst mit einem schwachen Trockensystem und starken Okular (Komp. ok. 8—12) auf.

Bei der Immersionslinse bringt man zwischen die Frontlinse und das Deckglas einen kleinen Tropfen Zedernöl (Ol. ligni Cedri $n_s = 1{,}515$ bei 18^0 C „homogene Immersion"), wodurch eine Brechung der Strahlen

an der unteren Linsenfläche vom Einfallslot vermieden wird und die Lichtstrahlen, die sonst beim Übergang aus dem Deckglas in die Luft gebrochen und unausgenützt bleiben würden, in das Objektiv insgesamt einzudringen vermögen. Im Gegensatz zu den Trockensystemen erreichen wir auf diese Weise einen Strahlenkegel mit einem größeren Öffnungswinkel. Bei der Einstellung des Immersionssystems bringt man zunächst durch Senken des Tubus die Linse mit der Kuppe des Zedernöltropfens in Kontakt und versucht durch vorsichtige Handhabung des Triebrades ein eben noch sichtbares, verschwommen angedeutetes Bild von dem betreffenden Objekt zu erhalten. Die feinere Einstellung wird durch die Mikrometerschraube besorgt. Nach der Untersuchung entfernt man jedesmal sehr vorsichtig mit einem, mit Benzin oder Xylol getränkten, weichen Lappen (am besten altes, gewaschenes Battisttuch) den Öltropfen vom Objektiv. Vom Deckglas wird das Öl durch leichtes Streichen mit einem in Benzin oder Xylol getauchten Pinsel beseitigt. Diese Prozedur muß mit einiger Vorsicht geschehen, da sonst der durch eingedicktes Zedernöl befestigte Deckglasausstrich verschoben wird und sodann eventuelle Kreuztischnotizen unbrauchbar werden. Es empfiehlt sich jedoch, trocken fixierte Ausstrichpräparate, die nach Giemsa oder Löffler gefärbt wurden, gar nicht mit einem Deckglas zu bedecken, sondern das Immersionsöl durch Übergießen mit Xylol zu entfernen.

Von besonderer Wichtigkeit ist der Beleuchtungsapparat nach Abbé, der aus einem Spiegel, einer Irisblende und einem aus einem Linsensystem gebildeten Kondensor besteht. Als Spiegel dient ein Plan- oder Hohlspiegel. Da die meisten Strahlen im Objekt zur Vereinigung kommen, sofern sie die Kondensorlinse parallel treffen, so ist besonders bei den Immersionssystemen ein Planspiegel anzu-

wenden. Der Hohlspiegel liefert viele konvergente Strahlen, er tritt nur bei größerer Nähe der Lichtquelle in Dienst. Wenn man bei Tageslicht mikroskopiert, ist es zweckmäßig, das Licht von einer weißen Wolke oder von einer entsprechend montierten Mattscheibe aufzufangen. Um das andere Auge (falls es angängig ist, soll man mit dem linken Auge mikroskopieren) möglichst zu schonen, ist eine Abblendung des übrigen Lichtes durch eine große, passend angebrachte, schwarze Papptafel anzuraten. Auch kann man durch Einklemmen einer monokelartigen, schwarzen Korkscheibe o. e. ä. in das andere Auge denselben Zweck erreichen. Gute Dienste leistet die plastische Lichtschutzkappe nach Mayer (Firma Lautenschläger).

Bei Anwendung von künstlichem Licht pflegt man zwischen Mikroskop und Lampe eine mit Wasser oder noch zweckmäßiger mit blauer, ammoniakalischer Kupfersulfatlösung gefüllte Schusterkugel anzubringen, die das Licht konzentriert. Dem Tageslicht nahe kommt in bezug auf die Lichtstärke die Koch-Wolzsche Mikroskopierlampe mit Zirkonleuchtkörper (nach Schiefferdecker). Auch eine Auerlampe ist zu empfehlen. In letzter Zeit hat sich besonders das sogen. hängende Gasglühlicht nach Zeiß bewährt. Blendendweißes Licht wird durch Einlegen von Mattscheiben oder blauen Glasscheiben gedämpft.

Der Kondensor selbst wird durch ein Linsensystem gebildet, dessen Brennpunkt für parallele Strahlen (Planspiegel) nahe der Objektebene liegt, so daß zu dem Objektiv ein Strahlenkegel mit einem großen Öffnungswinkel kommt. Aus dem hier angedeuteten Grunde ist wegen der verschiedenen Entfernungen der künstlichen Lichtquellen der Beleuchtungsapparat in der Richtung der optischen Achse nach unten oder oben durch Triebschrauben verschiebbar eingerichtet.

Durch Verschiedenheiten im Lichtbrechungsver-

mögen der einzelnen Teile des Protoplasmas im weitesten Sinne des Wortes entsteht durch Diffraktion der durchgehenden Strahlen das sogen. Strukturbild des mikroskopischen Präparates, das gewissermaßen nur aus Linien und verschieden abgestuften Schatten besteht und für dessen Zustandekommen die maximale Beleuchtung überflüssig ist. In diesem Falle pflegt man den Kondensor auszuschalten und bedient sich der Blenden allein. Anders verhält sich dies bei dem Farbenbild, das durch Absorption der durchgehenden Strahlen im Präparat entsteht, und für das eine maximale Beleuchtung nötig ist; — es muß ein möglichst weiter Beleuchtungskegel erzielt werden, daher wird der Beleuchtungsapparat eingeschaltet.

Für das Studium der Protozoen ist eine richtige Ausnutzung des Kondensors, der Blenden sowie der Mikrometerschraube eine unerläßliche Vorbedingung. Hierfür gibt es aber keine besonderen Vorschriften, sondern man muß sich diese Fertigkeit durch eine längere Übung aneignen. Zur Sichtbarmachung von „ultramikroskopischen" Teilchen sowie zur Schnelldiagnose von *Treponema pallidum* dient nach Zsigmondy und Siedentopf der Dunkelfeldbeleuchtungsapparat. Zur Beleuchtung kleinster Teilchen, filtrierbarer Erreger usw., konstruierte Reichert (Münchner med. Wochenschrift 1906) einen Spiegelkondensor, der das Objekt durch Strahlen von größerer Apertur beleuchtet und durch Strahlen geringerer Apertur abbildet. Mit diesem Spiegelkondensor kann mit jedem Trockenobjektiv ohne besondere Zurichtung mikroskopiert werden. Im Präparat werden durch den Kondensor, dessen Blende alle Strahlen, deren Apertur geringer als 1,05 ist, ausschaltet, nur durch Beugung abgelenkte Strahlen wahrgenommen. Der Reichertsche Spiegelkondensor (zweite Konstruktion) kann an Stelle des gewöhnlichen Abbéschen Be-

leuchtungsapparates in das Diaphragma des Mikroskops eingesetzt werden. Eine einfache Dunkelfeldsbeleuchtung wird erzielt, indem man in den Diaphragmaträger des Abbéschen Beleuchtungsapparates eine Zentralblende von 24 mm Durchmesser einschaltet (käuflich). Das dünne, mit nicht viel korpuskulären Elementen erfüllte Präparat wird auf den nach oben geschraubten Kondensor mit Zedernholzöl aufgekittet; mikroskopiert wird mit Apochromat 3,0—0,95 oder Objektiv 7 von Seitz. Besonders zu empfehlen ist als der beste Dunkelfeldapparat ferner der Spiegelkondensor mit Paraboloidfläche von Siedentopf (Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie 1907). Mikroskopieren mit Objektiv DD v. Zeiss, Okular 12, 18. Durch alle diese Apparate wird ein mehr oder weniger vollständiges Dunkelfeld erreicht, in dem die suspendierten Teilchen, vor allem die Syphilisspirochäten, im Gegensatz zu den Bakterien vollkommen aufleuchten, indem an ihnen die in das Auge kommenden Strahlen gebeugt werden; durch Diffraktionserscheinungen werden die Konturen der Spirochäten verdoppelt, die dann größer erscheinen. (Landsteiner-Mucha, Wiener klin. Wochenschr. 1906, Beer, Münch. med. Wochenschrift 1907 usw.)

Zum Zeichnen der mikroskopischen Präparate ist der sogenannte Zeichenapparat zu empfehlen, bei dem durch Brechung und Reflexion durch Spiegel und Prismen gleichzeitig das Bild des Zeichenpapiers, das auf einem Zeichentisch oder Zeichenkasten in der Höhe des Objekttisches des Mikroskopes angebracht ist, und des Objektes sichtbar gemacht wird. Man braucht dann bloß bei entsprechender Abblendung mit einem harten, scharf gespitztem Bleistift die Konturen des sichtbaren Objektes nachzuzeichnen. Zu empfehlen ist der Abbésche Zeichenapparat.

Für die Durchmusterung einer größeren Anzahl

von Präparaten (Malaria) ist ein beweglicher Objekttisch nötig. Durch zwei bewegliche, zueinander senkrecht stehende Schlitten, die längs einer Noniusskala laufen, kann das Präparat genau durchgesehen, jede einzelne Stelle scharf eingestellt und durch die Nonienindices bezeichnet werden. Zum Markieren der Blutausstriche ist der Markierapparat von Winckel (Göttingen) von großem Nutzen.

Von weiteren Hilfsapparaten ist für das Präparieren feiner Objekte, wie Insekten (Mücken, Fliegen usw.), Arachnoideen (Zecken), eine binokuläre Lupe von Zeiß empfehlenswert. Gute Dienste leistet ein heizbarer Objekttisch für Untersuchungen der lebenden Malariaplasmodien und Dysenterieamöben.

Ein Polarisationsapparat ist nötig für die Untersuchung der doppeltbrechenden Eigenschaften des Malariaplasmodienpigmentes, verschiedener Einschlüsse und apoplasmatischer Strukturen des Protistenzelleibes. Zum Messen der Objekte wird ein Okularmikrometer benutzt.

Bei der Untersuchung lebender Objekte leistet die Methode des hängenden Tropfens gute Dienste. Die fraglichen Lebewesen werden mittels einer Kapillarröhre in einem kleinen Tropfen auf die Mitte eines reinen, entfetteten Deckglases gebracht und das derart beschickte Präparat mittels einer Ehrlichschen Pinzette umgekehrt über die eingeschliffene Mulde eines hohlen Objektträgers mit einem luftabschließenden Medium wie Vaseline festgekittet. Der Abschluß dieser feuchten Kammer muß möglichst dicht und genau sein. Bei der Untersuchung benutzt man eine enge Blende und ist bemüht, ein Strukturbild zu gewinnen. Nach dem oben angedeuteten Prinzip ist Schulzes feuchte Kammer gebaut, nur daß die Mulde des Objektträgers noch von einem eingeschnittenen rinnenförmigen Ring umgeben ist, der zur Aufnahme von Wasser dient. In manchen Fällen kann man in dieses Wasser noch kleine

Grünalgen, wie Spirogyra oder Desmidiaceen, hineinbringen, die dann im Lichte O abspalten und so die Sauerstoffspannung in der feuchten Kammer regulieren.

Die Dicke der in Verwendung stehenden Deckgläschen darf im allgemeinen nicht 0,16 mm überschreiten. Die Grenzen betragen 0,1 und 0,2 mm. Für Blutausstriche verwendet man die dünnen Blutdeckgläschen.

Die tingierten Deckglaspräparate werden meist mit Canadabalsam, die nach Giemsa-Romanowsky gefärbten Deckglaspräparate mit eingedicktem säurefreien Zedernöl (nach Koch und Schaudinn) an die gut gereinigten Objektträger festgekittet.

Von anderen Instrumenten stehen im Gebrauch: Präpariernadeln und -lanzetten, Scheren, Skalpelle, Ehrlich- und Cornetsche Pinzetten mit rechtwinklig gebogenen Griffen, die selbsttätig die Deckgläschen festhalten (für die Löfflersche Geißelfärbung zu empfehlen) u. a. m. Die Objektträger werden am zweckmäßigsten mittels eines Schreibdiamanten signiert.

Zum Zeichnen der Präparate bedient man sich des Bristolzeichenpapiers, japanischer Pinsel und verschieden harter, scharf gespitzter Bleistifte.

Sogenannte Vitalfarbstoffe.

Bei der Untersuchung der lebenden Objekte leisten die sogen. Vitalfarbstoffe in verschiedenen hohen Verdünnungen (meist in physiologischer Kochsalzlösung oder Leitungswasser, das allerdings meist alkalisch reagiert) häufig sehr gute Dienste. Unter der großen Menge der bis jetzt erprobten Vitalfarbstoffe wären folgende zu empfehlen:

I. Bismarckbraun (Brandt, Arch. f. Anat. und Phys. Phys. Abt. 1878, S. 563). Brandt benützt eine

Lösung von 1 : 3000 (Biolog. Zentralbl. Bd. 1, 1881, S. 202). Für Nahrungsvacuolen 1 : 20,000—30,000. Es färbt oft das Protoplasma gelblich, vor allem aber verschiedene Granulationen rotbraun.

II. Methylenblau rectific. (Methylenblau B. X. wird weniger gut vertragen.) Ist nach Overton besonders in Cholesterin, Lecithin usw. löslich, färbt jedoch nicht in allen Fällen das Protoplasma, das in letzter Linie eine Lipoidemulsion von Proteinen ist. Färbt postmortal besonders in alkalischen Medien; Zusatz von org. Säuren verhindert die Färbung. Dasselbe gilt von Azur I. „Vitalfärbungen" bei Spirochäten; Trep. pallidum. Löfflers Methylenblau und Spur von NaOH.

III. Das von Ehrlich, Ascoli und Levaditi (Journal de Physiologie et de Pathologie générale No. 3, 1901) eingeführte Oxazin Brillantkresylblau. Es färbt manche Granulationen metachromatisch (violett und blau). In manchen Fällen nimmt in der absterbenden Zelle das Karyosom sehr deutlich den Farbstoff an, weshalb es besonders bei Trypanosomenuntersuchungen zu empfehlen ist.

IV. Für die vitale Färbung ist ein sehr geeigneter Farbstoff das zur Gruppe der Eurhodine gehörige Neutralrot, das Ehrlich zuerst in die histologische Technik einführte. Seine Eigenschaften sind in der Folgezeit mehrfach studiert worden (Mayer, Sitzungsber. d. naturw. med. Vereines Lotos 1896; Prowazek. Zeitschrift f. wiss. Zool. Bd. 83, 1897; Fischel, Untersuch. ü. d. vitale Färbung, Anatom. Hefte Heft 52/53, 1901; Plato, Berl. klinische Wochenschrift 1899 usw. und Arch. f. mikroskop. Anatomie Bd. 56, Heft 4).

Es ist ein von Witt entdeckter, sogenannter küpenbildender Farbstoff, der in die Zelle aufgenommen und am Orte seiner elektiven Speicherung in eine gefärbte Oxyform übergeführt wird, die je nach dem Farbenton sogar die Alkali- und Säureverteilung im Protoplasma

bis zu einem gewissen Grade anzeigt (gelbrot = alkalisch, kirschrot = sauer). Durch Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd oder Spuren von Eisenchlorid kann das Leukoprodukt des Farbstoffes in der Zelle nachgewiesen werden.

Unter dem Einfluß der intramortalen Reduktionen entfärben sich die tingierten Einschlüsse. Es kann jedoch später wieder eine Färbung (Paramaecium) eintreten.

Mit dem Farbstoff färben sich in vielen Protistenzellen die Kerne besonders in schwach alkalischen Medien (Bicalciumphosphat) und können im gefärbten Zustande sogar den ganzen Teilungsprozeß durchlaufen (dieses wurde für Pflanzen von Douglas Campbell, für Metazoen [Amphibienlarven] von mir, für Opalina ranarum und Nyctotherus cordiformis von Przesmycki nachgewiesen). Nach Przesmycki (Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München 1899, Heft I) färben sich die verschiedenen Bestandteile des lebenden Kernes (Chromatin und Achromatin) verschieden. Besonders gut nehmen die Kerne der parasitischen, auf eine geringe O-Spannung abgestimmten Infusorien den Farbstoff an. Bei parasitischen Flagellaten tingieren sich auf verschiedenen Entwicklungsstadien die Innenkörper der Kerne (Karyosome bei Trichomastix und Trichomonas).

Außerdem färben sich verschiedene Granulationen, die zu der Verdauung und Assimilation in naher Beziehung stehen und zum Teile Fermentträger sind. In dieser Hinsicht sei besonders auf die auch technisch interessante Arbeit von Nirenstein hingewiesen (Zeitschrift für allgemeine Physiologie, herausgegeben von Verworn 1905).

Ferner kann man mit dem Farbstoff apoplasmatische Strukturen, die mit Myelinen und Paramyelinen verwandt sind (Kölsch), zur Darstellung bringen. Bei gewissen Erdamöben färbt sich die äußere lipoid-

haltige Niederschlagsmembran. Bei manchen Infusorien färbt sich regionär das zuweilen lokomotorisch stark beanspruchte Protoplasma.

Mit dem Farbstoff kann man ferner alle Etappen der Verdauung in den sogenannten Nahrungsvakuolen der Ciliaten (Prowazek, Nirenstein) verfolgen. Wendet man den Farbstoff in höherer Konzentration an, so ist man in der Lage, den Nachweis zu erbringen, daß die kontraktilen Vakuolen (Paramaecium) auf gewissen Stadien alkalisch (gelbrot) reagieren.

Trotzdem ist das Neutralrot für die Protistenzellen kein absolut indifferenter Körper. Nach Heinz (Handbuch der experimentellen Pathologie und Pharmakologie) ist es in Verdünnungen von 1 : 800 oder 1 : 1000 für Paramäcien giftig. — Man setzt am besten mit einer engen Öse einen kleinen Tropfen der sehr verdünnten, nicht zu alten Neutralrotlösung zu dem Deckglaspräparat hinzu oder läßt einen gleichen Tropfen auf dem Objektträger eintrocknen und setzt später auf die angetrocknete Farbschichte den Tropfen mit den Infusorien dazu.

V. Dem Neutralrot ähnlich ist das Neutralviolett, nur daß es in stärkeren Lösungen noch giftiger als Neutralrot ist. Metachromasie.

VI. Rasch färbt das Nilblausulfat und Nilblauchlorhydrat. Kristallisiert leicht aus.

VII. Für vitale Kernfärbungen empfiehlt schließlich Przesmycki Auramin (1 : 2000).

VIII. Kongorot (Säurennachweis in Vakuolen).

IX. Dimethylamidoazobenzol (einige Tropfen der alkal. Lösung zu Wasser; hellgelb; Plasma gelb, manche Nahrungsvakuolen fuchsinrot.

X. Methylorange (Säure rot, Alkali gelb).

XI. Tropaeolin OO (gelbe Lösung durch Säuren gelbrotrot, Alkali gelb).

Von anderen Vitalfarbstoffen sei hier noch Dahlia (Certes), verdünnte wässerige Hämatoxylinlösung

(Brandt), Bleu de quinoléine und Cyanin (Certes, Zool. Anz. IV, 1881, No. 81 u. 84) genannt. Der letztgenannte Autor löst die Farbstoffe (Chinolinblau 1 : 500 000) in Infusorienwasser und wendet sie ganz schwach an. Doppelfärbungen mit Neutralrot und Methylenblau führte zuerst Pausinger, dann Ružička (Zeit. f. wiss. Mikroskopie XXII. Bd. 1905) aus; letzterer zeigte, daß Methylenblau dabei chemisch postmortal färbt, während seine eventuelle Färbung der lebenden Zelle auf physikalischer Grundlage beruht, dagegen färbt Neutralrot vital im chemischen Sinne.

Bezüglich der Vitalfärbung seien hier noch einige Bemerkungen aus der Arbeit von Fischel (Anatom. Hefte 1901) zitiert: „Das lebende Gewebe nimmt nur basische Farbstoffe auf, saure dagegen nicht, und zwar solche basische Farbstoffe, welche entweder den einfachen Ammoniakrest NH_2 enthalten oder einen solchen, in welchem der Wasserstoff durch ein der fetten Reihe angehöriges Alkoholradikal (Methyl, CH_3, oder Äthyl, C_2H_5) vertreten ist.“ „Die Ursache der Giftigkeit läßt sich aus der chemischen Konstitution nicht ermitteln.“ „Die Reaktion der Zellen spricht entschieden dafür, daß hier eine Färbung eines lebendigen Bestandteiles des Zellkörpers vorliegt“, dagegen weiter: „Nicht alles, was sich in der lebenden Zelle färben läßt, braucht übrigens, wie schon die Tinktion der Pigmentkörnchen zeigt, lebendem Protoplasma anzugehören.“ —

In manchen Fällen werden die lebenden beweglichen Protisten in farbigen Medien beobachtet. Für das Studium der Gregarinenbewegung (Schewiakoff) ist die Anwendung von verschiedenen Tuschelösungen zu empfehlen. Certes (Bull. soc. Zool. France 13, Vol. 1888, p. 230) wendet eine Lösung von Anilinschwarz, Fabre-Domergue eine konzentrierte Lösung von Diphenylaminblau an (Anm. Microgr. Paris Tome 2, 1889, p. 545).

Stark bewegliche Objekte werden durch zähflüssige

Medien (Gummi, Gelatine) in ihrer Beweglichkeit behindert und einer bequemeren Beobachtung zugänglich gemacht. Bei Infusorien mit pulsierenden Vakuolen kann man auf diese Weise die Entleerung der Vakuole studieren und den entleerten Flüssigkeitstropfen sogar neben dem Organismus eine Zeitlang beobachten (Römer).

Darstellung der Kernsubstanzen.

Von besonderer Wichtigkeit für das Studium der Protistenzelle ist die Darstellung der Kernsubstanzen, in erster Linie der sogenannten Chromatine, die bei diesen Zellen oft nicht einmal an einen morphologisch definierbaren Kern gebunden sind, sondern in Form von sogenannten Chromidien in der Zelle selbst zerstreut vorkommen (Hertwig, Schaudinn). Da das Wesen der histologisch-zytologischen Färbung derzeit noch ziemlich unbekannt ist und wir in diesem Sinne kein ausschließliches Kriterium für den Nachweis der Kernsubstanzen besitzen, sind wir in erster Linie darauf angewiesen, den entwicklungsgeschichtlich-morphologischen Weg zu beschreiten und entweder auf diese Weise das Entstehen jener Substanzen aus einem wohl charakterisierten Kern darzulegen oder die Ausbildung eines richtigen Kernes aus den oben erwähnten Chromidialmassen nachzuweisen. Nebenbei kann man sich zum Nachweis der Chromatine folgender Methoden bedienen (vgl. Carnoy, Biol. Cellulaire p. 208):

Das Chromatin löst sich in konzentrierten Mineralsäuren, in verdünnten Alkalien, in Kaliumkarbonat und Natriumphosphat. In 10proz. Kochsalzlösung wird es gallertig und löst sich manchmal auf. Für die Lösung

der erwähnten Substanzen, sofern man nur frische Zellen zur Verfügung hat, eignet sich 1proz. Kalilauge, Kaliumkarbonat (40—50 Proz.) und rauchende Salzsäure. Gar nicht oder nur teilweise anverdaut werden die Chromatine durch Pepsinsalzsäure und Trypsin (teilweise). (Zur Darstellung des Periplasts der Trypanosomen zu empfehlen.) Nach Beale löst man zu diesem Zwecke den getrockneten pulverisierten Saft aus den Magendrüsen des Schweines in destilliertem Wasser, filtriert und behandelt damit die Objekte unter dem Deckgläschen bei 37° C bis zu mehreren Stunden. Kuskow (Arch. f. mikr. Anat. 30, Bd. 1887, S. 32) löst 1 Teil Pepsin in 200 Teilen einer 3prozentigen Oxalsäurelösung und behandelt damit die Zellen.

Das Chromatin wird ferner nicht in Saponin und Sapotoxin gelöst, dagegen ziemlich verändert in taurocholsaurem Natrium (1 : 20 in physiolog. Kochsalzlösung in braunen Flaschen), das das Protoplasma der Protozoen: Flagellaten, Spirochäten, im Gegensatz zu den Bakterien und Pilzen, mit Ausnahme der Pneumokokken, löst.

Über weitere diesbezügliche Fragen sei auf das Buch von Zimmermann, Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, Jena, 1896, verwiesen.

Als Reagens auf Chromatin wird Methylgrünessigsäure (wässerige starke Lösung mit Zusatz von 1proz. Essigsäure) empfohlen, doch fällt oft die Färbung schwach aus, und manchmal bleibt die Reaktion dieses basischen Farbstoffes, der „mit einem Scheine von Berechtigung" ein Kernfarbstoff ist (Fischer, Fixierung und Färbung des Protoplasmas, Jena, S. 192), ganz aus. Gegen diese Reaktion sprachen sich auch bereits Galeotti und Neeresheimer aus.

Das Plastin (Nukleolensubstanzen, Karyosome) ist meistens stärker lichtbrechend, färbt sich mit Heidenhains Eisenhämatoxylin tief schwarz, nach der

Giemsa-Romanowsky-Methode, sofern es rein auftritt, wie in den Metazoennukleolen oder auf manchen Stadien der Karyosomentwicklung bei den Trypanosomen (gepreßte ♀-Formen, Stadien aus den Kulturen), blau, wird aber in den meisten Fällen von dem roten Chromatin derart maskiert, daß sich die fraglichen Gebilde zumeist rotviolett färben. Mit Methylgrünessigsäure nimmt es keine Färbung an. Nach Schwarz ist es mit den Albuminen verwandt; nach Ružička (Archiv f. Zellforschung 1. Bd. 1908) ist es ein Albuminoid und unlöslich in Wasser 20 Proz. NaCl, Kalilauge, Essigsäure, 1—3 Proz. Salzsäure, Pepsin und Trypsin. Manche Plastine (Infusorien) sind in 1 Proz. Kalilauge jedoch löslich.

List (Mitt. Zool. Neapel, 12. Bd., 1896) stellt die Kernkörper mit Berlinerblau dar; zu dem mit Sublimat fixierten Material (meist Schnitte) setzt man zwei Tropfen von $1^1/_2$proz. gelben Blutlaugensalz, nach fünf Minuten gießt man ab und setzt ein bis zwei Tropfen 1proz. Salzsäure zu — es bildet sich Berlinerblau, das in den von List untersuchten Zellen den Nebennucleolus färbte. Zuweilen ist es angezeigt, dem Objekt Eisen einzuverleiben, indem es auf eine halbe Stunde in Eisenchlorid (10 Tropfen einer Lösung von $^1/_2$ g Eisenchlorid auf 100 g Wasser gemischt mit 5—15 Tropfen 1proz. Salzsäure und 50 g Wasser) gebracht wird.

I. Stamm. Cytomorpha.

I. Klasse. Rhizopoda.

1. Ordnung. Amöbina.

Amöben untersucht man zumeist frisch im Deckglaspräparat, das mit Wachsfüßchen versehen und gegen das Verdunsten der Untersuchungsflüssigkeit mit einem

Wachs- oder Vaselinerand umrandet worden ist. Den Wachsrand stellt man sich am besten in der Weise her, daß man mit einem kurz vorher angebrannten, mit einem kurzen Docht versehenen Wachsstock rasch den Rand des Deckglaspräparates entlang fährt. Die amöboiden Bewegungen kann man mechanisch durch einen Zusatz von Kirschgummilösung verlangsamen (Eismond, Zool. Anz., 13. Jahrg., 1890).

Reinkulturen von Amöben im Sinne der Bakteriologen sind bis jetzt nicht gelungen. Man kann sie höchstens in Gemeinschaft von Bakterien „züchten"; dieses ist in verdünnter Bouillon und in dünnen Stroh- und Heuinfusen möglich. Frosch (1897) und Nägler (Arch. f. Protistenkunde 15. Bd. 1909) züchteten mit Erfolg Amöben auf: 90 Proz. Leitungswasser, 10 Proz. Nährbouillon und 0,5 Proz. Agar-Agar. Celli und Fiocca „züchteten" Amöben in einer 5proz. genau alkalisierten Lösung von Fucus crispus in Wasser oder Bouillon. (10 ccm Nährboden, 1 ccm $^1/_{10}$ Normal-Kalilauge.) Auf diese Weise kann man meist Myxamöben und Strohinfusamöben halten. Schardinger züchtete Amöben in einem wässerigen Heuaufguß, dem 1—$1^1/_2$proz. Agar hinzugefügt worden war.

Besonders zu empfehlen ist folgender Nährboden: 30—40 g Heu werden in 1 Liter Wasser $^1/_2$ Stunde aufgekocht, sodann filtriert und dem Filtrat 1—$1^1/_2$proz. Agar zugesetzt, dieses durch Kochen aufgelöst. Dann alkalisiert man durch kohlensaures Natrium und füllt ohne Filtration in Probiergläschen ab. Es bildet sich ein Niederschlag, den man jedoch leicht zum Absinken bringen kann. Ausgedehnte Züchtungsversuche hat Vahlkampf angestellt. Auf festen Nährböden wie Kartoffeln züchtete Gorini Amöben.

„Die Zahl der zur Züchtung geeigneten Kulturböden ist ziemlich groß, und man kann sagen, daß bis auf wenige Ausnahmen fast alle zur Verwendung

gelangten Substrate tauglich waren." Im allgemeinen ist ein neutrales bis schwach alkalisches Medium das geeignetste. Reinkulturen (ohne Bakterien) sind nicht ausführbar. Zur Anfangskultur wählt man am besten Amöbencystenmaterial, das man ca. 72 Stunden mit 20proz. Lösung wasserfreier Soda behandelt. Unter diesen Bedingungen sterben die Bakterien ab. Den Kulturen muß man dann die spez. Nahrungsbakterien zusetzen. Besonders sind feste Nährböden zu empfehlen, und zwar: 1. Nährstoff Heyden 1—2,0, Agar 1,5 und Leitungswasser 100,0. 2. Nutrose 1—2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 3. Somatose 1—2,0 Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 4. Pepton Witte 1—2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 5. Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 6. Dieselben Nährböden mit Strohdekokt, welcher bis zur Weißweinfarbe verdünnt war, an Stelle des Leitungswassers. 7. Fucus crispus 5,0 und Leitungswasser 100,0. 8. Stärkekleister von der Konsistenz des Agars. Die Nährböden müssen einen hohen Wassergehalt besitzen. Am geeignetsten ist nach Vahlkampf für die Züchtung der Amoeba limax Fucus crispus und Heyden-Agar. Vielfach wurden jedoch statt der echten Amöben nur Myxamöben gezüchtet (nicht ausschlaggebende Kriterien dieser: leichte Cystenbildung, häufige Flagellatenzustände, Plasmodienbildung, Aufwärtskriechen der Amöben an dem Substrat). Beyrinck kultivierte die *Amoeba nitrophila* auf gereinigtem Agar, dem 0,2proz. $NH_4NaHPO_4 + 4H_2O$ und 0,5proz. Chlorkalium zugesetzt wurden. Reaktion neutral oder schwach alkalisch.

Alles nähere vgl. Frosch, Zur Frage der Reinzüchtung der Amöben, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 21, 1897, S. 927, sowie Casagrandi und Barbagallo, Über die Kultur von Amöben, Zentralbl. f. Bakteriologie Bd. 21, 1897, S. 579—589; Beyrinck, Zentralbl.

bis drei Tropfen 5proz. Essigsäure oder zwei Tropfen 10proz. Platinchloridlösung hinzu und ließ dann etwas davon unter das Deckglas hinzutreten.

Zu empfehlen sind auch Pikrinsäuregemische, die die Manipulation insofern vereinfachen, als man gleich im 70proz. Alkohol ohne Intermedien auswaschen kann. Aus eben demselben Grunde sind aber hernach Farben in alkoholischen Flüssigkeiten (Parakarmin, Boraxkarmin) oder Hämalaun und Karmalaun anzuwenden. Gute Resultate erhält man mit Pikrinessigsäure (3 Teile einer konzentrierten Lösung von Pikrinsäure und 1 Teil Eisessig). Auswaschen in 70proz. Alkohol.

In den meisten Fällen leisten gute Dienste Sublimatgemische ($^2/_3$ wässerige konzent. Sublimatlösung, $^1/_3$ Alkohol 90proz.) und das Flemmingsche Gemisch (25 Teile von 1proz. Chromsäure, 10 Teile 1proz. Essigsäure, 10 Teile 1proz. Osmiumsäure und 55 Teile Wasser), nur daß man im letzteren Falle nicht mit allen Farben färben kann. Vielfach wird in diesem Falle Safranin oder Gentianaviolett, Orange-G. empfohlen.

Färben kann man ferner die Amöben mit Alaunkarmin, Boraxkarmin, Pikrokarmin und verdünntem Grenacher's Hämatoxylin (fertig von Grübler zu beziehen, verdirbt leicht, längere Zeit in sehr dünnen Lösungen färben, eventuell in 40proz. schwach angesäuerten Alkohol differenzieren. Kontrolle unter dem Mikroskop, kurzes Auswaschen in Brunnenwasser. Alkoholreihe, Nelkenöl, Canadabalsam).

Schaudinn (Anh. Abh. Akad., Berlin 1899, S. 9) fixiert Trichosphaerium mit 1proz. Osmiumsäure oder mit einem Gemisch von einem Teil wässerigem Sublimat und zwei Teilen absolutem Alkohol, die Kerne werden mit einer 43proz. alkoholischen Alaunkarminlösung gefärbt. Das Färben und Auswaschen geschieht bis zum Einbetten in Zentrifugierröhrchen. Vahlkampf

Flemming's Sol (oft)

25 parts 1% chromic

10 parts 1% acid

10 parts 1% osmic

55 parts water

Schaudinn's Fixing Sol

1 part Watery Sublimate (Saturated)
2 parts absolute alcohol.

fixierte Amöben mit Erfolg in der Zenkerschen Flüssigkeit (Aqu. dest. 100,0, Sublimat 5,0, Natr. sulf. 1,0, Kal. bichrom. 5,0, Eisessig 5,0). —

Bei allen Manipulationen, Färbungen usw. ist stets streng darauf zu achten, daß die Objekte in einem flüssigen Medium verbleiben, weil sie sonst bis zur Unkenntlichkeit schrumpfen oder zerfließen, so daß vielfach nur der Kern übrig bleibt. Daher ist im allgemeinen die Methode des trockenen Deckglasausstriches nicht zu empfehlen.

Sind Amöben in großer Menge vorhanden, so konserviert man sie direkt mit Sublimatgemischen (vgl. oben) oder mit dem Flemmingschen oder Zenkerschen Gemisch in Zentrifugierröhrchen, zentrifugiert sie ab, wäscht im destillierten Wasser aus, färbt mit Alaunkarmin, Boraxkarmin usw. vor und bringt die Objekte nach jedesmaligem Abzentrifugieren in dem Röhrchen bis ins Chloroform und Chloroformparaffin, überträgt sie mit einer sauberen Pipette in eine kleine Mulde von hartem Paraffin, das in einem peinlichst mit salzsaurem Alkohol gereinigten Uhrschälchen zum Erstarren gebracht wurde. Dann bringt man das Ganze in den Thermostaten, läßt das Chloroform abdampfen und zerlegt nach dem raschen Erstarren des Paraffins die Amöben in dünne Schnitte.

Hernach kann man die Schnitte mit Heidenhains Eisenhämatoxylin färben. (Man läßt die Schnitte mindestens sechs Stunden lang in einer $2^1/_2$proz. wässerigen Eisenalaunlösung [violette Kristalle von schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak], wäscht mit destilliertem Wasser aus und bringt sie auf 48 Stunden in eine alte, oft gebrauchte Hämatoxylinlösung [1 g Hämatoxylin, 10 ccm 90proz. Alkohol, 90 ccm Wasser, fertig von Grübler zu beziehen], differenziert wenige Minuten in der oben genannten Eisenalaunlösung unter steter Kontrolle unter dem Mikroskop, bis das

Plasma ganz hell ist und die Kerne ein schwarzes Chromatingerüst zur Schau tragen, spült gründlich im Brunnenwasser ab, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam. Rosenbusch-Hartmann änderten diese Methode um:

1. Beizen Eisenalaun $3^1/_2$ % $^1/_2$—1 Stunde. Wasser.
2. Stammlösung:
   a) 1 % Hämatoxylin in 96 % (70 %) Alkohol,
   b) Lithionkarbonat gesättigte wässerige Lösung.

Von a) 10 ccm + von b) 5—6 Tropfen, Färbedauer 5—10 Minuten; unter Umständen Moment differenzieren, Wasser, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam.

Dysenterieamöben

untersucht man zunächst im lebenden Zustande, indem man mit einer Pinzette etwas von dem blutigen Schleim unter das Deckgläschen bringt. Es empfiehlt sich nicht mit physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen. Man muß ferner physikalische (Druck) und chemische Schädlichkeiten vermeiden. In manchen Fällen ist die Anwendung eines heizbaren Objekttisches von Nutzen. Für vitale Färbungen ist Methylenblau (1 : 20000 usw.), besonders Neutralrot (Entamoeba buccalis) anzuraten.

Für Dauerpräparate hat sich folgende Methode als die zweckmäßigste erwiesen:

Man streicht den Schleim möglichst dünn auf gut gereinigte Deckgläschen aus und läßt ihn rasch, ohne daß er eintrocknet, mittels einer Ehrlichschen Pinzette auf das folgende heiße, noch rauchende Gemisch mit der bestrichenen Seite nach unten auffallen:

konzentrierte wässerige Sublimatlösung 100 ccm,
absolut. Alkohol 50 ccm,
Eisessig 5 Teile,

oder noch einfacher:

$^2/_3$ konzentrierte Sublimatlösung + $^1/_3$ 90% oder absolut. Alkohol.

Nach höchstens 10 Minuten (besser ist es, gleich aus dem heißen Gemisch die Objekte in dasselbe kalte Sublimatgemisch zu übertragen) bringt man die Ausstriche in 60proz. Alkohol, wäscht dann mit 60proz. Jodalkohol (leicht gelb) das Sublimat aus, bringt die Präparate in Aqua dest. und färbt je nach Bedarf (Kern, Chromidien!) in einer verdünnten Lösung (Rotweinfarbe) von Grenacher's oder Delafield's Hämatoxylin, wäscht im Brunnenwasser, bis kein blauer Farbenton von den Objekten ausgeht, aus, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam. Jürgens (Veröffentl. a. d. G. d. Militärsanitätswesens, Heft 20, Berlin 1902) befestigt die möglichst dünnen, nur feuchten Ausstriche über einer Glaskammer mit 1—2% Osmiumsäurelösung, durch deren Dämpfe die Amöben abgetötet und in 10—20 Minuten fixiert werden. Bei Anwendung der Schulze'schen Kammer kann man den ganzen Fixierungsvorgang unter dem Mikroskop verfolgen und nach Belieben regulieren. Abspülen in Wasser. Safraninfärbung; durch „ganz dünne Essigsäure" wird der Innenkörper differenziert.

Jäger färbte die Dysenterieamöben noch mit Eosin nach.

Besonders zu empfehlen ist die Färbung der mit Sublimatalkohol (p. 26) oder Flemmingscher Flüssigkeit (p. 24) kurz fixierter Amöben mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (p. 25, 26). Am geeignetsten für Amöben ist die alte Eisenhämatoxylinfärbung.

Bei der Diagnosestellung achte man auch auf das Vorhandensein von Charcot-Leydenschen Kristallen. (Dysenterieamöben.)

Für Schnitte fixiere man entweder mit dem erwähnten Sublimatgemisch, mit Chromosmiumessigsäure (Flemmings Lösung) oder mit Zenkerscher Flüssigkeit (man löst 5 g Sublimat und 5 ccm Eisessig in Müllers Gemisch: Kaliumbichromat 2—2½ g, Natriumsulfat 1 g.

Aqua. dest. 100 ccm. Fixiert mehrere Stunden, wäscht in Wasser aus und behandelt die Schnitte mit 60% Jodalkohol und färbt mit Hämatoxylin (Eosinnachfärbung), Eisenhämatoxylin, Safranin oder Anilinwasser-Methylviolett. Nach Sublimatalkoholhärtung färbe man mit Toluidinblau wässerig mit einer Differenzierung in Orange G. (zu beziehen nur von Grübler, konzent. wässerige Lösung). Die fertigen Cysten der Entamoeba histolytica lassen sich nicht schneiden und springen vor dem Messer leicht aus (Schaudinn).

Bezüglich der Unterscheidungsmerkmale zwischen den verschiedenen parasitischen Amöben des Menschen sei auf Schaudinns „Unters. ü. d. Fortpflanzung einiger Rhizopoden", Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 19. Bd., Heft 3, 1903, Hartmann, Beihefte z. Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene 1908, Werner ebenda, verwiesen.

2. Ordnung. Foraminifera.

Man fixiert mit Sublimatalkohol ($^2/_3$ ccm wässerige Sublimatlösung + $^1/_3$ 90proz. Alkohol, Auswaschen in 60proz. Jodalkohol) oder mit Perény'scher Flüssigkeit (4 Teile 10proz. Salpetersäure, 3 Teile 90proz. Alkohol und 3 Teile $^1/_2$proz. Chromsäurelösung) und färbt mit Grenachers Hämatoxylin, mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, Alaunkarmin oder Safranin. Die Schalen werden durch Kalilauge oder Eau de Javelle (Kaliumhypochlorid) aufgelöst. Winter konservierte *Peneroplis* kurze Zeit nach dem Zerquetschen mit Osmiumdämpfen (Gamogonie). Zum Entkalken setzte er zu dem im 60proz. Alkohol liegenden fixierten Material soviel Salzsäuretropfen, bis kleine Blasen auf den Kalkschalen sichtbar wurden (8—20 Minuten). Winter färbte mit Boraxkarmin oder Alaunkarmin (15 Minuten) vor und mit Methylenblau nach. Schnitte werden 10 Minuten vorgefärbt mit: $^1/_2$ wässerige Pik-

rinsäure + $^1/_2$ wässeriges Säurefuchsin bis zu granatroter Färbung. Nachfärbung Heidenhains Eisenhämatoxylin (p. 25, 26).

Schaudinn (Zeitschrift f. wiss. Zoolog. 59. Bd., 1895, S. 193) fixiert Calcituba mit 1proz. Osmiumsäure oder mit einer Mischung von 1 Teil wässerigem Sublimat und 2 Teilen absolutem Alkohol. Um die Befruchtung der Flagellosporen der Polystomella zu studieren, sucht man sich auf gut Glück eine größere Anzahl von Individuen, die mit Chromidien oder teilweise mit Sporetienkernen erfüllt sind, aus, zerdrückt sie, saugt das Protoplasma mit einer Kapillare auf und verrührt das Ganze auf dem Deckglas einer feuchten Kammer.

3. Ordnung. Radiolaria.

Lo Bianco konserviert Thalassicolla eine Stunde lang mit $^1/_2$proz. Chromsäure, Acanthometra und Aulacantha mit 50proz. Alkohol oder mit konzentriertem Sublimat oder durch Zusatz von Osmiumsäure zu dem Seewasser. Gefärbt wird mit Hämatoxylin, Pikrokarmin oder Alaunkarmin.

Karawaiew fixiert Aulacantha 24 Stunden in einem Gemisch von gleichen Teilen von Eisessig und starker Flemming'scher Flüssigkeit (15 Teile 1proz. Chromsäure, 4 Teile 2proz. Osmiumsäure, 1 Teil Eisessig) und härtet mindestens 24 Stunden in dem letzteren Gemisch nach.

Borgert (Zool. Jahrbuch 14. Bd., 1900, S. 207) empfiehlt Sublimatlösung mit Essigsäure (10 : 2 oder 3) oder Pikrinosmiumplatinchlorid. (200 ccm gesättigte Pikrinsäurelösung + 1 g Platinchlorid in 10 ccm Wasser + 2 ccm Eisessig + 25 ccm 2proz. Osmiumsäure.) Weniger zu empfehlen. Färbung mit Kleinenbergs Hämatoxylin, Mayers Parakarmin (Grübler), Heidenhains Eisenhämatoxylin (siehe p. 25, 26).

Sphaerozoen werden nach Brandt (Fauna und Flora

des Golf von Neapel 1885) mit $^1/_2$—1proz. Chromsäure ($^1/_2$—1 Stunde) oder mit Jodalkohol (70proz. Alkohol, gleiche Menge Seewasser + etwas Jodtinktur $^1/_2$ Std., Auswaschen im Süßwasser, Alkoholreihe) oder mit 5 bis 15proz. Seewassersublimatlösung fixiert.

Bezüglich der Fixierung der Heliozoa gelten die bei den Ciliaten angeführten Vorschriften (Totofärbung mit Alaunkarmin, Pikrokarmin, Beales Karmin. Schnittfärbung: Eisenhämatoxylin.)

II. Klasse. Mastigophora.

Flagellaten im weitesten Sinne des Wortes.

Für freilebende Flagellaten empfiehlt sich nächst der Untersuchung im lebenden Zustande die Konservierung derselben nach der Massenmethode im Zentrifugierröhrchen (p. 25).

Man fixiert entweder mit Flemmings Gemisch (15 Teile 1proz. Chromsäure, 4 Teile 2proz. Osmiumsäure, 1 Teil Eisessig) (Steuer), oder mit dem Sublimatalkoholgemisch (p. 26) und färbt mit Grenachers Hämatoxylin (Grübler), Alaun-, Boraxkarmin oder nach jedesmaligem Zentrifugieren mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (Steuer). Auch kann man sie weiter nach der S. 25 beschriebenen Methode für Schnitte behandeln. Lauterborn (Zeitschr. f. wiss. Zoologie 59. Bd., 1895) fixiert Dinoflagellaten 10 Minuten in Flemmings-Gemisch, 35proz—absolut. Alkohol, beläßt sie dort 24 Stunden, bringt sie langsam ins Wasser, bleicht sie mit 3proz. Wasserstoffhyperoxyd und färbt mit Pikrokarmin oder Delafields Hämatoxylin. Schnitte werden mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (p. 25, 26) gefärbt.

Zacharias (Zool. Anzeiger 22. Bd., 1899) fixiert mit 2 Vol. konz. wässeriger Lösung von Borsäure und

Loffler's Flagella Stain is the easiest & best of them all esp. as it is so quick M.H.G.

The more mature the Loffler Mordant is the better

The C. fluctuans must be freshly prepared → & confirm this after MHG

3 Vol. konz. wässeriger Lösung von Sublimat. Burck (Archiv f. Protistenkunde 1909) fixiert Choanoflagellaten 1—2 Minuten mit Osmiumdämpfen.

Für die Färbung der Geißeln ist Löfflers Geißelmethode zu empfehlen (Löffler, Zentralbl. f. Bakt., 6. Bd., 1889, S. 209. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop., 6. Bd., 1889, S. 359; 7. Bd., 1890, S. 368; Fischer, Jahrb. Wiss. Bot. 26. Bd., 1894, S. 188).

Als Beize wendet man ein Gemisch von 10 ccm 20proz. Tanninlösung + 5 ccm kalt gesättigter, wässeriger Lösung von Ferrosulfat oder Ferr. sulfur. oxydul. ammon. + 1 ccm wässerige oder alkoholische Lösung von Fuchsin oder Methylviolett oder Wollschwarz an. Beize fertig bei Grübler zu haben.

Das Deckglas mit dem Flagellatenausstrich klemmt man in eine mit rechtwinkligen Backen versehene Cornetsche Pinzette, begießt es mit einem Tropfen der erwähnten Beize-Mischung und erwärmt eine Minute lang, bis leichte Dämpfe aufsteigen, wäscht in Wasser gut ab, wiederholt event. die Prozedur 2—3mal und färbt in derselben Weise mit einer alkoholischen Fuchsinlösung in Anilinwasser (jedesmal frisch bereiten), der bis zu einer leichten Trübung eine $^1/_{10}$proz. Lösung von Ätznatron zugesetzt worden ist. Die Schwebefällung muß beim Erwärmen über der Spirituslampe verschwinden. Abwaschen, leicht trocknen mit Filterpapier, Zedernöl. (vgl. ferner pg. 75).

Parasitische Flagellaten wie Trichomastix, Trichomonas und Bodo fixiert und färbt man am besten nach der S. 26 beschriebenen Methode (Dysenterieamöben). Besonders die Heidenhainsche Eisenhämatoxylinfärbung ist zu empfehlen. Für die Darstellung der undulierenden Membran bei Trichomonas ist auch die Methode des Deckglasausstriches und Giemsafärbung geeignet. Bensen (Zeitschr. f. Hygiene und Infekt. 61. Bd., 1908) fixiert Lamblien mit Sublimat-

alkohol (p. 26) wäscht in Wasser aus, beizt 10 Minuten $3^1/_2$ Eisenalaun, Abspülen, färbt in Hämatoxylin 5:100 mit 6 Tropfen einer gesättigten Lithiumkarbonatlösung 30 Minuten, Differenzieren unter dem Mikroskop in $2^1/_2$proz. Eisenalaunlösung, Abspülen in fließendem Wasser 5 Minuten, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam. Es sind verschiedene Kulturmethoden von Flagellaten versucht worden: Meyer kultivierte *Ochromonas* auf Glukose, Maltose usw., *Monas amoebina* in Traubenzucker, *M. minima* auf Pepton. Zumstein (Jahrb. f. wiss. Bot. 1900) *Euglena gracilis* in: 0,5 Pepton + 0,5 Traubenzucker + 0,2 Zitronensäure + 0,02 $MgSO_4$ und 7 H_2O + 0,05 KH_2PO_4 + 100 Wasser oder 1,00 Pepton + 0,4 Traubenzucker + 0,4 Zitronensäure + 0,02 $MgSO_4$ und 7 H_2O + 0,05 KH_2PO_4 + 0,05 NH_4NO_3 + 98 Wasser. Küster (Arch. f. Protistenkunde 11. Bd., 1908) züchtete *Gymnodinium* von *Fucus serratus* und *vesiculosus* auf Fucusextrakt, der mit 2 Proz. Agar oder 10 Proz. Gelatine zu festem Nährboden verarbeitet wurde.

Trypanosomen.

Die Trypanosomen untersucht man zunächst bei Luftabschluß (Wachsrand, Zedernöl) im Deckglaspräparat, wo sie je nach der Art (am längsten T. lewisi, kurze Zeit Dourinetr.) verschieden lange Zeit am Leben bleiben. Nach Plimmer kann die undulierende Membran der Parasiten gut durch Zusatz von Zitronensäurenatron zu dem Blut, das in einem kleinen Tropfen einer 1proz. Gelatinelösung etwas eingedickt wurde, verdeutlicht werden. Mit Neutralrot färben sich unterhalb des vegetativen Kernes verschiedene Granulationen. Mit Brillantkresylblau wird das Karysom in dem bläschenförmigen Kern beim Absterben verdeutlicht. Mit Jod färben sich nur manchmal einzelne Granula. Durch Pepsinverdauung stellt man den Periplast dar. Durch

taurocholsaures Natrium (1 : 20, phys. Kochsalzlösung, braune Flasche im Eisschrank aufbewahren) werden die Trypanosomen bis auf einen Periplast- und Kernschatten aufgelöst, durch Saponin oder Sapotoxin (Neufeld) wird in erster Linie das Protoplasma in Lösung übergeführt und die Objekte sehen gleichsam eviszeriert aus. Färbung nach Yamamoto. Durch Essigsäurezusatz kann der Kern verdeutlicht werden.

Für die Untersuchung der gefärbten Trypanosomen eignet sich die Deckglasausstrichmethode. Es werden die Objekte möglichst dünn auf Blutdeckgläschen oder Objektträger ausgestrichen, lufttrocken gemacht, in absoluten Alkohol (15—30 Minuten) oder Alkoholäther fixiert, wiederum getrocknet und dann meist mit Giemsa's Gemisch gefärbt.

Die fertige Lösung von Giemsa's Eosinazur bezieht man von Grübler (Leipzig). Aus einer braunen Tropfflasche läßt man je einen Tropfen des Gemisches zu 1 ccm Wasser (dest.) in einem jedesmal gut gereinigten, vor allem säurefreien Meßzylinder zufließen. Nach leichtem Umschütteln des Gemisches färbt man sodann möglichst bald die Präparate. Nach etwa $^1/_2$ Stunde und mehr wäscht man im destillierten Wasser aus, trocknet sorgfältig und schließt in säurefreiem Kanadabalsam oder in eingedicktem Zedernöl ein.

Laveran behandelt die Präparate nach dem Abspülen eine Minute lang mit 5proz. wässeriger Tanninlösung und spült in Wasser ab.

Zuweilen empfiehlt es sich, 1—10 Tropfen einer 1 promill. Kaliumkarbonatlösung den 10 ccm Wasser vor der Herstellung der Färbemischung hinzuzusetzen. Für die Darstellung der undulierenden Membran ist die Fixierung mit Osmiumdämpfen (10 Sekunden) anzuraten. Statt des Methylenazurs, das in Giemsa's Farbstoff vorkommt, benutzt Ehrlich Dimethyl-Thionin von der Firma Cassella in Frankfurt a. M.

Dieser Fixierung und Färbung auf trockenem Wege wurde für zytologische Zwecke mit Recht eine Fixierung auf nassem Wege von Breinl, Salvin-Moore, Rosenbusch, Hartmann u. a. vorgezogen. Man fixiert nach Art der Dysenterieamöben (pg. 26) mit Sublimatalkohol oder Flemmingschem Gemisch (pg. 23) beizt 1 Stunde in $3^1/_2$ Eisenalaun, färbt $^1/_2$ Stunde in $^1/_2$proz. Lösung von Hämatoxylin im destillierten Wasser, dem einige Tropfen konzentrierter wässeriger Lithiumkarbonatlösung zugesetzt wurden; wäscht in dest. Wasser ab, differenziert rasch in derselben Eisenalaunlösung, Brunnenwasser, ohne zu Trocknen, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam. (Vgl. pg. 25—26.)

Rosenbusch (Beihefte Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene 1908) beizt mit $3^1/_2$ Eisenalaun, färbt mit 1proz. alkoholischer Hämatoxylinlösung, die durch Zusatz von Lithiumkarbonat verstärkt wurde 5 Minuten und differenziert wie oben. Arndt fixiert den nassen Ausstrich $^1/_2$ Stunde in Aceton und färbt mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (pg. 26). Giemsa hat seine Methode für „nass" fixierte Ausstriche von Trypanosomen, Spirochäten, Ciliaten, Korneaausstriche von Vaccine umgearbeitet, die sehr zu empfehlen ist:

1. Härten in $^2/_3$ Sublimat, $^1/_3$ Alkohol 80% ohne Essigsäure. (24 Std. u. länger.)
2. Fünf Min. in verdünnte wässerige Jod-Jodkalilös.
3. Abspülen in Wasser.
4. 5 Min. in 0,2 proz. wässerige Natriumthiosulfatlös.
5. Gut Abspülen in Wasser. 6. Färben mit Giemsalösung. 7. Abspülen. 8. Durchführen durch folgende Flüssigkeiten:

a) Aceton 95 Th. + Xylol 5 Th.
b) „ 70 „ + „ 30 „
c) „ 70 „ + „ 30 „
d) Xylol. pur.
e) Zedernöl.

[illegible] method for [illegible] Sinuses

This "strongly recommended" procedure
gave good results c Flue strongisto (or EB[illegible])
on 3-3-22; (Nasal & Branch[illegible] [illegible])

But, Dont over differentiate

Weitere Färbungsmethoden, mit denen die Trypanosomen dargestellt werden können, werden im Kapitel „Malaria“ näher besprochen werden.

Für Schnittfärbungen konservierte Halberstaedter (Zentralbl. für Bakteriologie u. Parasitenk. 38. Bd., 1905) kleine Organstücke der erkrankten Tiere mit konz. wässeriger Sublimatlösung: 12—24 Stunden. 24 Stunden auswaschen in fließendem Wasser, Alkoholreihe, Paraffin, Schnittefärben 10 Minuten mit polychromem Methylenblau, Abspülen in Wasser. Einige Sekunden absol. Alk., Xylol, Kanadabalsam. Nach Neporojny und Jakimoff kann man auch mit Safranin und Indigokarmin färben, außerdem kommt man mit einigen Abänderungen auch mit Romanowski- oder Giemsafärbung zum Ziele. (Rasch durch eine Acetonreihe bringen. Das Überbringen in Alkohol kann man ersparen, indem man die Schnitte nach der Färbung und Abspülen im Wasser in wasserfreies Aceton (säurefrei!) überführt; Xylol, Kanadabalsam. Schließlich wäre auch die Färbung mit Heidenhains Eisenhämatoxylin anzuraten (pg. 26).

Geringe Mengen von Trypanosomen im Blut weist man durch Überimpfung von größeren Blutmassen an empfängliche Tiere nach. (Führt nicht immer zum Ziel.) Bei der Schlafkrankheit stellt man die Trypanosomen in der Zerebrospinalflüssigkeit durch Zentrifugieren von etwa 5—10 ccm Punktionsflüssigkeit im Bodensatz neben den mononuklearen Leukozyten fest, nachdem die roten Blutkörperchen durch Essigsäure vorher zerstört worden sind. Auch die Methode des dicken Ausstrichs nach Roß (vgl. Malaria) ist für diese Zwecke zu empfehlen. Große Blutstropfen werden leicht angestrichen, an der Luft getrocknet, einige Minuten in eine Mischung von 2proz. Formalin und $^1/_2$—1proz. Essigsäure āā gebracht; Hämoglobin auf diese Weise entfernt. Nachfixierung mit Alkohol, Färbung nach Giemsa.

Die Versuchstiere werden mittels einer sterilen Injektionsspritze (Rekordsp.) entweder subkutan oder intraperitoneal mit dem Trypanosommaterial infiziert. Beim Vorhandensein von geringen Blutmengen ist besonders der letztere Infektionsmodus anzuraten. Die Gerinnung des Blutes wird durch Hirudin, Nat. citricum (geringe Mengen 5proz.) oder in manchen Fällen bloß durch physiologische Kochsalzlösung (Glasperlen schütteln) hintangehalten.

Kultivierung der Trypanosomen.

Die Trypanosomen sind zuerst von Mc. Neal und Novy im Kondenswasser einer Mischung von Agar und Blut (Kaninchenblut) gezüchtet worden.

Ursprünglich setzten die beiden Autoren für die Kultur von Trypanosoma Lewisi 1 Teil defibrinierten Blutes zu 5 Teilen Agar zu. Später empfahlen sie eine Mischung von 2 Teilen Blut zu 1 Teil Agar als die beste. Nach Nocht und Mayer genügen gleiche Teile Agar und Blut, das Kaninchenblut wird den bei 50° verflüssigten Agarröhrchen zugesetzt und dieselben dann schräg gelegt. Nach dem Erstarren werden sie mit Gummikappen versehen und zum Auspressen des Kondenswassers auf 24 Stunden in einen Thermostaten von 37° gebracht. Mathis (C. R. h. d. B. 1906. No. 36) erhitzte den Nährboden auf 75—100°, ohne nachteilige Folgen bei der Züchtung zu bemerken. Das Impfblut wird mit der Lührschen Spritze aus dem Herzen genommen und mit etwas Kochsalzlösung gemischt. Die erste Impfung geschieht mit einer sterilen Pipette, die weiteren Impfungen mit Ösen (3.) Nach 3 bis 5 Tagen treten im Kondenswasser die ersten Agglomerationssterne von Trypanosomen auf. Mc. Neal und Novy hielten eine Kultur 306 Tage (bei Zimmertemperatur). (Cult. of Tryp. Lewisi Contribut. t. Med. Research to V. Vaughan Juni 1903.)

Bei 37° vermehren sich die Kulturen lebhafter, sterben aber später infolge der Zersetzung des Hämoglobins ab. Die Kultivierung von Tryp. Brucei ist wesentlich schwieriger. Leicht ist die Kultur von Tryp. Lewisi, Froschtrypanosomen, Fischtrypanosomen, Vogeltrypanosomen und *Tryp. Cruzi* (Chagas.) Mc. Neal und Novy (D. t. cultivation of Tryp. Brucei, Jour. of Inf. Diseases 1904, vol. 1, p. 1; ferner ibid. 1904, v. 1, p. 517) empfehlen:

Extrakt von 125 g Rindfleisch in 1000 g Wasser:

Agar	20 g,
Pepton	20 g,
Kochsalz	5 g,
Normal (5,3%) Na_2CO_3	10 ccm.

Nocht und Mayer nehmen statt 20 g 25 g Agar.

Man mischt je ein Volumen dieses Nährmediums bei 55—60° mit der doppelten Menge defibrinierten Kaninchenblutes. Das Optimum für die Kulturen ist 25°. Trypanosoma evansi wurde von Laveran und Mesnil auf dem genannten Nährboden bis zur zweiten Generation gezüchtet. Irikura (Baikingaku zasshi 1909) setzt zu 10 ccm Bouillon $^1/_2$—2 ccm Kaninchen- oder Pferde-, Rinder- oder Meerschweinchenserum und verimpft darauf Tryp. 25—30° C Thermostat. Verschluß der Kulturen durch Paraffin. Boehm kultivierte Rattentrypanosomen mit Erfolg auf gew. Agarnährboden.

Bei der Übertragung der Trypanosomen spielen die Tsetsefliegen eine große Rolle, und es seien hier einige bis jetzt bekannte, methodologische Andeutungen über die Untersuchung dieser Fliegen gestattet.

Die Glossinen kommen meist im lichten Baum- oder Buschbestand vor und folgen den Flußläufen sowie sumpfigen Ufern der Seengebiete, obzwar sie Sander

und Lommel auch entfernt von Flüssen angetroffen haben. Das Verbreitungsgebiet der Fliegen ändert sich etwas in der Regenzeit. Sie sind an besondere Örtlichkeiten, die sogen. Fliegengürtel (Flybelts) gebunden und sind schattenliebend. Zupitza (Beihefte z. Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene 1908) fand die Puppen auch im Humus, Moos, Astgabeln der Bäume, Blattscheiden der Palmen usw.

Nach Stuhlmann (Anat. und Physiologie der Tsetsefliege, Pflanzer No. 24, 1905) muß man die Fliegen in der Gefangenschaft jeden 4.—5. Tag füttern, indem man das mit Gaze zugebundene Glas einfach einem Tier (Maultier, Rind usw.) auf die Haut setzt. Die Fliegen untersucht man möglichst frisch in 0,75proz. Kochsalzlösung oder im Blutserum (Ausstrichmethode). Den Fliegen werden zunächst die Flügel und Beine abgeschnitten, der letzte „Leibesring" entfernt und von hier aus der Darm herauspräpariert. Durchschnitt des Leibes. Darmsaft. Für anatomische Zwecke tötet man sie im heißen Wasser oder heißen, schwachen Alkohol ab (Stuhlmann). Für Schnittserien empfiehlt sich eine Konservierung in der mehrfach erwähnten Sublimatalkoholessigsäuremischung pg. 26, die heiß angewendet werden muß. Alkoholreihe, Xylol, Paraffineinbettung. Färbung: Heidenhains Eisenhämatoxylin mit Bordeauxrotnachfärbung (der zweiten Differenzierungsbeize gleich zuzusetzen) oder Romanowsky-Färbung oder nach Halberstädter polychromes Methylenblau (S. 29). Die Rattenlaus (Hämatopinus) ist mit großer Wahrscheinlichkeit Überträger des Tryp. levisi. Mit zwei feinen Nadeln kann man leicht den Darm freipräparieren. Leibeshöhle!

Anhang: Spirochäten.

Die Spirochäten werden im lebenden Zustande nach denselben Methoden wie Trypanosomen untersucht. Mit Methylenblau färbt sich vital die Hühnerspirochäta

und die große Spirochäta balbianii (Perrin). (Spur des Farbstoffes.) Durch Zusatz von Spuren Kaliumkarbonat wird die Affinität zu den Vitalfarbstoffen erhöht. (Sp. pallida.) Mit Neutralrotfärbung kann man die verschiedenen Verdauungsstadien der von Leukozyten aufgenommenen Spirochäten des Ulcus tropicum sowie der Mundspirochäten verfolgen. Durch Kalilauge und taurocholsaueres Natrium werden die Spirochäten bis auf unbedeutende Schatten gelöst.

Im Deckglasausstrichpräparat werden die Spirochäten nach der Methode von Giemsa (S. 33) gefärbt. Oft ist es vorteilhaft, die Spirochätenausstriche gar nicht mit absolutem Alkohol zu fixieren, sondern sie sofort ohne Fixierung zu färben. Für die Darstellung der geißelartigen Periplastanhänge (besonders bei Spirochaeta balanitidis) ist die Methode der Löfflerschen Geißelfärbung (pg. 31) anzuempfehlen, nur ist vorher eine starke Verdünnung des Untersuchungsmaterials mit abgekochtem Brunnenwasser und eine Anfertigung von recht dünnen Deckglasausstrichen notwendig. Das Serum des trockenen Ausstrichs kann vor der Fixierung durch Einlegen in Aqua dest. entfernt werden (Paschen.)

Für größere rigidere Formen empfiehlt sich die nasse Ausstrichfixierung mit heißem Sublimatalkohol ($^2/_3$ konz. Sublimat [wässerig] + $^1/_3$ 90proz. Alkohol). Vgl. Amöbenfixierung. Nachfärbung entweder mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, Grenachers Hämatoxylin und Thionin. Nach Schellack (Arb. a. d. k. Gesundheitsamte XXVII. 1907) löst sich der Körper der Sp. in Sublimatalkohol und Zenker'scher Lösung oft in kleine Körnchen auf. Empfehlenswert ist Hermann'sche oder Flemming'sche Lösung (pg. 24) auf die Hälfte verdünnt.

Zettnow (Deutsche med. Wochenschr. No. 10, 32. Jahrgang) hat an der Rekurrenssp. mit Antimonbeize und

Äthylaminnachversilberung sogen. „peritriche Begeißelung“ sichtbar gemacht. Durch Erwärmen des verdünnten Mundspirochätenmaterials auf 40—50° C und nachträgliche Färbung mit Löfflers Geißelbeize kann man bei Spirochäta buccalis die Periplastfibrillen teilweise auffasern und so eine Peritrichie vortäuschen.

Die bei vielen Sp. während des Lebens wahrnehmbare, undulierende Membran bzw. ihre Randleiste (Spirochäta balanitidis, Spirochäta von Ulcus tropicum, Hühnerspirochäte usw.) kann man in Ausstrichen manchmal mit der Löfflerschen Geißelfärbung (S. 31) darstellen. Dazu ist besonders eine Vorbehandlung des dünnen Ausstrichmaterials mit destilliertem Wasser oder eine kurze Anmazeration durch 1 : 10 taurocholsaueres Natrium anzuraten.

Nach Weidenreich-Hoffmann und Halle ist für die Darstellung der Spirochäten auch folgende Methode empfehlenswert: 5 ccm 1proz. Osmiumsäure werden in eine flache Glasdose gegossen und 10 Tropfen Eisessig werden hinzugefügt. Gut gereinigte Objektträger oder Deckgläschen werden über die Dose gelegt und der Einwirkung der Dämpfe mindestens 2 Minuten ausgesetzt. Hernach fertigt man rasch über der „Dampfseite“ des Objektträgers oder Deckgläschens den Ausstrich an und läßt ihn zur Vollendung der Fixierung über der Glasdose 1—2 Minuten trocknen. Schließlich läßt man auf die Präparate für eine Minute eine dünne, hellrote Kaliumpermanganatlösung einwirken.

Nach dem Auswaschen färbt man entweder nach Giemsa oder mit Triacid. Alfred Kraus (Münchner m. W. 06 No. 52) empfiehlt, die nach der Weidenreich-Hoffmann-Halleschen Methode angefertigten mit Giemsa gefärbten Präparate zur Beseitigung der Farbstoffniederschläge in 30proz. wässrig Tanninlösung zu bringen, ca. $^1/_2$ Minute. Spirochäten rot auf hellem

Grunde. Hartmann und Mühlens (Zeitschr. f. Hyg. 06) untersuchten die Spirochaeta dentium und buccalis, indem sie eine Normalöse des in 1 großen Tropfen Wasser und 1 Tropfen 1proz. Osmiumsäure verteilten Ausgangsmateriales auf einem entfetteten Objektträger ausstrichen. Färbung: Karbolfuchsin und Löfflers Geißelfärbung.

Nikiforoff färbt Rekurrensspirochäten in Schnitten nach folgender Methode:

1. Fixierung in einer Mischung zu gleichen Teilen Kali bichromicum 5proz. in wässeriger Lösung und gesättigte Sublimatlösung in 0,6proz. NaClIösung.
2. Alkoholhärtung.
3. Paraffineinbettung.
4. 24stündige Färbung: in alk. 1proz. Tropäolinlösung 5 ccm; konzent. wässerige Methylenblaulösung 10 ccm und Ätzkalilösung (1 : 1000) zwei Tropfen.
5. Wasserspülung.
6. Eintauchen in Alkoholäther.
7. Bergamottöl-Xylol-Kanadabalsam.

Auf analogen Prinzipien beruht die neuere Färbung von Löffler (Deutsch. med. Woch. 1907) für verschiedene Blutparasiten:

Färbung in: 4 Teile (2,5proz. Borax — 1proz. Methylenblau) + 1 Teil Unnas polychromes Methylenblau (Grübler). Dazu gleiche Menge von 0,05proz. Bromeosin B. extra oder extra A. G. (Höchst.)

Differenzierung in: 5 Teile Tropäolin OO (Konz. wässerig. Lösung) + 0,5 Teile Essigsäure + 100 Teile Wasser; diese Lösung in zehnfacher Verdünnung anwenden.

Die Rekurrenssp. kann man vor allem im Schnitt nach Levaditi besser nach Yamamoto färben (pg. 47).

Kultivierung der Spirochäten.

Levaditi gelang es, die Hühnersp. in Kollodiumsäckchen in der Bauchhöhle eines Kaninchens anzureichern. Ebenso glückte ihm (Compt. rens. soc. d. Biologie No. 27, 06) die Anreicherung der Spirochaeta refringens: Eiter einer balanoposthitischen Erosion wurde in nicht koeguliertes Menschenblut ausgesät und in Kollodiumsäckchen gebracht. Diese kamen auf 4 Tage in die Bauchhöhle von Kaninchen. Spätere Aussaaten in nicht erhitztem Menschenserum blieben in Kollodiumsäckchen 5—8 Tage in der Bauchhöhle der Kaninchen. Mühlens hat ferner die Mundspirochäten in Pferdeserumagar (1 : 3) in hoher Schicht (Schüttelkultur) und Serumbouillon unter streng anäroben Verhältnissen nach 10 Tagen gezüchtet (Deutsche med. Wochenschrift S. 797, No. 20, 30. Jahrg., 1906). Genauere Angaben finden sich: Mühlens und Hartmann Zeitschrift f. Hygiene, 06. Schüttelkulturen: Agarröhrchen (Reaktion schwach alkalisch oder besser neutral) zur Austreibung des Sauerstoffs $^1/_2$ St. gekocht. Nach Abkühlung auf 45^0 Zusatz von Pferdeserum, das etwa $^1/_2$ St. auf 58—60^0 erhitzt worden ist und sich auf 45^0 abgekühlt hat (2 Teile Agar, 1 Teil Serum). In den noch flüssigen Serumagar (40—42^0) wird aus einer in Serumbouillon angelegten Verdünnung des Ausgangsmaterials mit Platinnadel geimpft, sodann zur Gewinnung möglichst isolierter Kolonien eine weitere Verdünnung angelegt. Der geimpfte und geschüttelte Agar wird, nachdem er erstarrt ist, auf 37^0 (nicht Zimmertemp.) gebracht. Wachstum nach 9—12 Tagen (hauchartige, weißliche Trübungen). Agarsäule wird zur Untersuchung der Kolonien in Scheiben geschnitten. An Stelle des Pferdeserums kann: Hammel-, Kalbs-, Kaninchen-, Ziegenserum sowie Aszitesflüssigkeit (Erfolg unsicher) treten. Schüttelkultur kann durch Stich-

no mention here of method of Pyrogallol-Serum of

Proca Danila & Stroe {K.W. Vol 7. P. 802.}

{10 cc Serum Fractionally Sterilise.
{1 cc Pyrogallol Soln {Pyrogallic acid 1 fm
NaOH 2 fm
aq dest 100 cc

Heat to 80°C. to Solidify Serum.

Add 1:1000 Formol to hinder other orgs if necessary.

Inoculate in depth: Close with oil or wax.

kultur ersetzt werden. Todd (Lancet 4464) züchtet Sp. duttoni auf 200 ccm Eigelbnährboden mit Zusatz von Mäuseabkochung „100 ccm of a sterile mouse decoction, made by boiling the skinned bodies of six mice in 500 ccm of water“ — und sterilem defib. Mäuseblut. Nährboden vorher 6—8 Wochen partieller Autolyse unterworfen.

Treponema pallidum. („Syphilisspirochäta“.)

A. Lebend wird die Trep. p. für Zwecke der Schnelldiagnose im Dunkelfeld oder mit Homog. immers. Ocular 6—8, Vitalfärbung mit Methylenblau, dem Kalium- oder Lithiumkarbonat spurenweise zugesetzt wurde, untersucht.

B. Für die Färbung der Tr. geben Schaudinn und Hoffmann (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 20, 1904, S. 527) folgende Methode an: „Die gut fixierten Deckgläser kommen für 16 bis 24 Stunden in eine stets frisch hergestellte Mischung von:

1. 12 Teilen Giemsas Eosinlösung (2,5 ccm einprozentige Eosinlösung auf 500 ccm Wasser).
2. 3 Teile Azur I (Lösung 1 : 1000 Wasser).
3. 3 Teile Azur II (Lösung 0,8 : 1000 Wasser).

Nach kurzem Abspülen in Wasser werden die Deckgläser getrocknet und in Zedernöl eingeschlossen.

Die dünnen Ausstriche werden in der Weise hergestellt, daß man ein Tröpfchen von durch Schaben und Reiben gewonnenem Reizserum (Hoffmann) oder durch Quetschen mit einer Pinzette herausgepreßtem Quetschserum auf ein Deckglas oder Objektträger bringt und nach Art der Blutausstriche durch ein anderes Deckgläschen verstreicht. Trocknen an der Luft. 10 Minuten Fixierung in Alk. absolut. Bei alten Präparaten Fixierung überflüssig.

Giemsa (Deutsche med. Wochenschr. 1905, No.

26, S. 1026 und 1907 No. 17) gibt folgende fertige dauernd haltbare, bei Grübler (Leipzig) käufliche Lösung, die jetzt allgemein angewendet wird, an:

Azur II-Eosin	3,0 g
Azur II	0,8 g
Glyzerin (Merk)	125,0 g
Methylalkohol (Kahlbaum I)	375,0 g.

Von dieser, in einer dunkeln Tropfflasche aufbewahrten Farblösung fügt man unter leichtem Schütteln in einem weiten, gut gereinigtem säurefreien Meßzylinder je einen Tropfen zu 1 ccm dest. Wasser und färbt die Deckglaspräparate in einer Farbenplatte etwa $^1/_2$ event. 1 Stunde. Objektträger färbt man am besten im Farbtrog nach Mayer (Firma Lautenschläger). Abtrocknen. Bezüglich einer von Giemsa angegebenen Schnellfärbemethode, sei auf die Angaben in Deutsch. med. Wochenschrift 1907 verwiesen.

Kiewiet de Jonge färbt mit folgender Mischung:

Azur II . . .	0,160,
Eosin	0,100,
Äthylalhohol ad	100,000.

Mit der Pipette werden 15 Tropfen der Farblösung auf das Objekt gebracht, dann kommen gleich 30 Tropfen Aqua destillata, und das Ganze wird durch vorsichtiges Blasen gemischt. Färbungsdauer 1 Std. Abspülen im Wasserstrahl. Trocknen. Zedernöl.

Außerdem seien hier der Vollständigkeit wegen noch folgende Methoden angeführt:

a) May (Münchener med. Wochenschrift Jahrgang 53, No. 8) färbt mit einer 0,25proz. methylalkoholischen Lösung von eoinsauerem Methylenblau, bringt dann die Präparate auf 1 Minute ins destill. Wasser, und ohne abzutrocknen fügt er dazu einen Tropfen einer 0,5proz. Methylenazurlösung; nach etwa 2—4 Minuten tritt die endgültige Färbung ein.

Composition of Giemsa

Note. The stains in Giemsa are
The compound of Azur II & Eosi
Azur II are
The fluids are methyl alcohol 75%
and Glycerine 25%

b) Gonder und Hoffmann färben 24 Stunden mit frischer Anilinwassergentianaviolettlösung.

Plöger färbt eine Minute lang mit 10proz. einer konzentrierten alkoholischen Gentianaviolettlösung in $2^1/_2$proz. Karbollösung und spült dann gut mit Wasser ab.

c) Reitmann (Deutsche med. Wochenschrift 1905, No. 25, S. 997) fixiert die dünnen Ausstriche 10 Minuten in absolutem Alkohol, spült im Wasser ab und überführt sie etwa auf 5 Minuten in eine 2proz. Phosphorwolframsäurelösung, wäscht dann in Aqua dest. und 70proz. Alkohol, dann abermals in Aqua dest. und färbt unter Erwärmen bis zur Dampfbildung mit einer verdünnten Karbolfuchsinlösung.

d) Herxheimer (Münch. med. Wochenschrift 39, 26. September 1905) und Herxheimer und Opificius (Münch. med. Wochenschrift No. 7, 13. Februar 1906) färben mit einer filtrierten, heißgesättigten Gentianaviolettlösung (10 g Gentianaviolett in 100 ccm Aq. dest.) 15 Minuten, Wasserspülung, Trocknen, Kanadabalsam.

Herxheimer und Hübner (Deutsche mediz. Wochenschrift 1905, No. 26, S. 1023) empfehlen filtrierte, wässerige Lösungen von Nilblau BR oder Capriblau 1 : 1000 (16—24 Stunden).

e) Davidson (Berliner klinische Wochenschr. 31, 1905) löst etwa eine Messerspitze von Kresylviolett „Rextra“ der Mühlheimer Farbenfabrik in 100 ccm Wasser und färbt damit verschieden lang die Syphilispirochäten.

f) Berger (Münchener med. Wochenschrift 1906, No. 25) fixiert die Ausstriche 5—10 Minuten im absoluten Alkohol, behandelt sie eine Minute mit einigen Tropfen Azur II vor; abspülen, trocknen. Färbt 3—5 Minuten mit einer Dahliastammlösung: 4 ccm konz. alkohol. Dahlialösung in 20 ccm Aqua dest. Abspülen, trocknen. Neutraler Kanadabalsam.

g) dünne, lufttrockene, nicht fixierte Deckglasausstriche färbt Marino mit einigen Tropfen Marinoblau (Bleu de Marino 0,1, Methylalkohol 20,0). Nach 3 Minuten kommen dazu einige Tropfen einer wässerigen Eosinlösung (0,05 : 1000,0). Nach 2 Minuten abspülen, einschließen in Zedernöl.

h) Gut gereinigte Objektträger werden 2 Minuten Osmiumdämpfen ausgesetzt, dann rasch ein Ausstrich angefertigt und dieser abermals dem Osmiumdampf (Osmiumsäure 1 Proz. 5 ccm + 10 Tropfen Eisessig) ausgesetzt, getrocknet, später mit hellroter Kaliumpermangnatlösung behandelt. Färbung nach Giemsa (Weidenreich, Hoffmann, Halle.) Diese Methode wird oft angewendet.

Im übrigen sei auf meine Zusammenstellung in der Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie Bd. 32, 1906, S. 1—12 verwiesen.

C. Für den Nachweis der Treponema ist die Anwendung der Schnittechnik von besonderer Wichtigkeit.

Zunächst sei hier die ältere Methode von Bertarelli und Volpino (Zentralbl. f. Bakteriologie I. Abt., 40. Bd., 1905, Heft 1) angeführt: Die sehr dünnen Schnitte (—5 μ) bleiben 24—48 Stunden in einem 0,2—0,5proz. Silbernitratbad. Daraufhin werden sie ausgewaschen und kommen in ein Bad von 3,0 Tannin, 5,0 Acid. pyrogallic., 10,0 Natrium acet. fus., 350,0 Aq. dest., das zur Geißelfärbung nach van Ermengen benutzt wird. Nach $^1/_4$ Stunde kommen die gelblich verfärbten Schnitte in das oben beschriebene Silbernitratbad zurück und verbleiben dort so lange, bis sie einen bräunlichgelben Farbenton angenommen haben.

Die am meisten benutzte Methode der Treponemaschnittfärbung nach Levaditi (Ann. Inst. Pasteur, No. 1, 25./106, vol. 20, S. 43) sowie Compt. rend. soc. d. l. Biologie, vol. 60, No. 3, 26. Januar 1906) sei hier in

The Bertarelli & Volpino Method off. on Elementary Bo

This method tried for demonstrating Strongyloplasm in Sarcoma (RCS) Section of Mary McIntyre. Oct 1923. The tissue fixed in formol saline, & absolute overnight is embedded & cut as thin as possible. The sections taken up on slides are brought through Xylol and falling alcohols to water. The section is now flooded with 0·5% Silver nitrate, warm and placed for from 1/2 - 1½ hours at 37°C. It is washed in distilled and some Van E reducer poured on & warmed till steam arises. After 5 mins the prep. is light yellow in 1/2 hour & 1 hour at 37 in silver preps: brown in places in the 1½ hours prep. Now abs xylol & mount. Result Strongylos seen in large nos in the Sarcoma cells. Elementary Bodies

[illegible] Water [illegible] for [illegible]

[illegible] It succeeded [illegible] Sarcoma Section [illegible]

Would Hydroquinone [illegible] [illegible] Van E [illegible]

* this Yamamoto method excellent
mtter 14.2.24

der etwas abgeänderten Form von Hoffmann und Beer (Deutsche med. Wochenschrift 1906, No. 22) angegeben:

1. Formalinfixierung (1 Teil Formalin + 9 Teile Wasser) 24 Stunden lang. Zur Erweichung des Gewebes kann man nachträglich 5% Eisessiglösung anwenden.

2. Übertragung möglichst kleiner Stücke (0,5 ccm) in 96proz. Alkohol über Nacht.

3. Überführung in destilliertes Wasser (einmal wechseln) bis zum Sinken der Stücke (15 Minuten).

4. Die [an feinen, weißen Zwirnfäden aufgehängten] Stücke kommen in eine jedesmal frisch zu bereitende Mischung von 90 ccm, 1,5proz. Silbernitratlösung + 10 ccm reinsten Pyridins und verbleiben dort 3 Stunden bei Zimmertemperatur und weitere 3—5 Stunden im Thermostaten bei 45—50° (dunkle Flasche mit Glasstopfen).

5. Dann kommen sie in eine jedesmal frisch zu bereitende Reduktionsmischung:

a) 90 ccm 4proz. wässerig. Pyrogallollösung + 10 ccm reinen Azetons (Stammlösung).

b) 85 ccm von a) + 15 ccm Pyridin puriss., hierin verbleiben die Stücke bei Zimmertemperatur über Nacht.

6. Rasche Paraffineinbettung. Die Schnitte kann man mit 1% Jodgrün, Löfflers Methylenblau oder Toluidinblau nachfärben. Für Vergleichszwecke kann man die Sp. nach Versè durch braune Jodjodkaliumlösung, Abspülen im Wasser und konzentrierte Natriumthiosulfatlösung wieder entfärben. Bei der alten Levaditimethode kommen die Objekte nach 3. in 1,5% $AgNO_3$-Lösung 3—5 Tage bei 38° C. Dann Reduktion in Acid. pyrogallic. 4,0, Formol 5,0, Wasser 100. 48 h Zimmertemp. Wasser, Alkoholreihe, Xylol, Paraffin. Yamamoto (Cent. f. allg. Pathol. 1909) fixiert in „verschiedenen Lösungen"; sodann schneidet er die Organteile in 10 mm lange und 5 mm dicke Stücke, wäscht in Wasser 24 Stun-

den aus (bei 70% Alkohol nicht nötig), erwärmt die Objekte in 10 ccm 5% Silbernitratlösung 48 Stunden bei 37° C (braune Flaschen) und reduziert in 20 ccm von: Acid. pyrogallic. 2,0, Acid. tannic. 1,0, Aq. dest. 100,0 über 24 Stunden alte Lösung 24 St. bei 37° C (Flüssigkeit nach 30 Minuten erneuern), hernach 1 Stunde Wasser, Alkoholreihe, Xylol, Paraffin; besser Celloidineinbettung, zum Aufhellen des Schnittes statt Xylol Origanumöl. Diese Methode ist der zweiten Methode von Levaditi vorzuziehen. Schmorl färbt Gefrierschnitte mit Giemsas Lösung (s. 43) 6—12 Stunden, differenziert in verdünnter Lösung Kalialaun, destill. Wasser, Glyzerinalaun. Zusammenfassend sind für den Nachweis der Treponema folgende Methoden zu empfehlen:

1. Mikroskopische Untersuchung der nach der Methode von Giemsa gefärbten Ausstriche aus Quetsch-, Schabe- oder Reizserum. Oder Lebenduntersuchung im Dunkelfeldapparat.

2. Mikroskopische Untersuchung des Drüsenpunktionssaftes (frisch oder gefärbt). Vgl. Hoffmann, Die Ätiologie der Syphilis, Springer 1906.

3. Nachweis der Spirochäten im Blute nach der Methode von Noeggerat und Staehelin (Münch. med. Wochenschrift 1905, No. 31, S. 1481): man fängt mindestens 1 ccm Blut aus einer Vene oder aus dem Ohrläppchen in einer ungefähr zehnfachen Menge $^1/_3$proz. Essigsäure auf, zentrifugiert das Ganze in einer starken Zentrifuge und verarbeitet den Bodensatz zu Ausstrichpräparaten.

4. Exzision der fraglichen erkrankten Teile und der histologische Nachweis der Treponema nach der Silberimprägnierungsmethode (Levaditi, Yamamoto).

5. Verimpfung des Reizserums oder des durch Punktion gewonnenen Drüsensaftes nach der Methode von Hoffmann (Deutsche med. Wochenschrift 1905, No. 18, S. 712) an ein empfängliches Tier (Affe,

Amphadenoma
Lands 1924 (Poulter gland after incubation)
Result of many trials to stain orgs therein

(1) Yamamotos method found better than Levaditi or Mandulians modification apparently 14.2.24. Procedure:—

After 1st fixing in formal Saline 48 hrs, washed in alcs & after 3 changes at 10 mins interval put to soak in water giving several changes till it sank. Then into 5% Ag at 37 for 2 days. Then a rinse in water & into Ys reducer changed in 30 mins, & over night in fresh at 37 & kept another day at 37. Result very Good (Poulter incubated gland 14.2.24)

(2) Repetition of above, omitting alcohol. Soaking 24 hrs in water after formal Saline leaving 4 days in 5% Silver and alc at 37 2 days in Ys reducer with 2 changes gave still better result (Prawse inc gland 28.2.24) = Spiros.

(Reiz [illegible]

Juice of [illegible])

(Gut [illegible])

March 1926 (2 [illegible])

Comparison on Σ Congen Liver of Yamamoto and Bertarelli methods showed that both were v. good, Bertarelli being best. Procedure :—

Yamamoto

1. Fix in formal Saline.
2. Thoroughly get rid of Formal by much washing in H_2O & then by taking up to Absolute & back to H_2O.
3. Keep for 4 days in sealed brown bottles at 37°C in 5% Silver.
4. Wash in Water & Reduce in Yamamoto Reducer (Changed in 30 mins) for 1 day at 37. Wash well. Soak in 50% abs at 55 for an hour, dehydrate cut.

Bertarelli

1. Fix (as above or) in abs (V. thin [illegible] 0.6 - 0.7)
2. Wash well as in 2 above.
3. Put for 4 days at 37 in Silver 1.5, Water 50cc, absolute 50cc + 4 drops glacial acetic in brown bottles, sealed at 37.

Kaninchenauge, Bertarelli), kürzeste Inkubation beim Affen etwa 14 Tage.

Das zerkleinerte Material (auch Stücke von winziger Größe) bringt man in die vordere Augenkammer des Kaninchens und weist die Trep. nach Levaditi's Methode in dem Bindegewebe unterhalb der Bowmanschen Membran des Corneaepithels (etwa nach zwanzig Tagen) nach.

Die Treponema untersucht man lebend (etwas mit 0,85 % NaCl-Lösung verdünnt) im sorgfältig mit Vaseline umrandeten Deckglaspräparat (O-Abschluß) mit homog. Immersion und Okular 8, 12. Man kann sie ziemlich lange Zeit — nach Beer etwa vier Wochen — im beweglichen Zustande in solchen Präparaten halten (Hoffmann, Beer, Reuter).

Für Serumversuche, Agglomeration usw. (das Serum wird am besten nach der Wrightschen Methode in Glasröhrchen aufbewahrt und mit einer Normalöse dem hängenden Tropfen zugesetzt; gleichzeitig Kontrolle) empfiehlt sich die Untersuchung im hängenden Tropfen. Durch taurocholsaures Natrium (10%, Siebert, Archiv f. Protistenkunde, 11. Bd., 08) werden zunächst die Chromatinkörnchen verdeutlicht, später werden die Trep. aufgelöst, Pepsin + HCl (2 Stunden Thermostat) bringen sie nur zum Aufquellen, ebenso 10—20 % NaCl-Lösung.

Kultur der Treponema.

Levaditi und Mc. Intosh gelang eine Anreicherung der Treponema in Kollodiumsäckchen im Affenperitoneum (Ann. Inst. Pasteur 1907). Schereschewsky (Deut. med. Wochenschrift, 35. Jhrg., 1909) züchtet bei 37° 3—5 Tage auf Pferdeserum, das bei 58—60° zu gallertiger Konsistenz gebracht wurde und zirka 3 Tage im Thermostaten bei 37° teilweise autolysierte. Versenken eines Papel- oder Kondylom-

fragmentes oder Stücke von fötaler Luesmilz mit hakenförmiger Glaskapillare in das Medium. Wachstum am frühesten am 3., meist 5.—12. Tage.

Schnelldiagnose.

Empfiehlt sich die Anwendung des Dunkelfeldapparates oder das Tuscheverfahren nach Buri: 1. Öse des Sekrets wird mit etwas Wasser verdünnt, davon verrührt man 1. Öse mit einem kleinen Tropfen käuflicher chinesischer Tusche und verstreicht das Ganze zu einem bräunlichen Fleck. Trocknen. Sofortige Untersuchung mit Immersion.

III. Klasse. Sporozoa.

I. Ordnung. Hämosporidia.*)

Malaria.

Zunächst ist das Studium des lebenden Objektes anzuraten. Dazu ist allerdings gutes Licht und Übung in der Blendenbenutzung Voraussetzung. Nach Schaudinn kann man mit einiger Vorsicht denselben Parasiten 3—4 Stunden unter dem Mikroskop ohne Entwicklungsstörungen beobachten.

Auf einen entfetteten Objektträger bringt man einen kleinen Bluttropfen, legt darüber rasch ein Blutdeckgläschen, so daß überall an den Rändern etwas von dem Blut, das mit dem Fließpapier entfernt wird, heraustritt und umrandet das Präparat mit Vaseline oder Wachs. F. Plehn entnimmt das Blut unter Vaselineabschluß aus der Fingerbeere und fängt es auf einem

*) Neueren Forschungen zufolge ist es zweckmässiger, diese Ordnung an die Flagellaten-(Trypanosomen)Klasse Mastigophora anzugliedern. Hartmann faßt sie als *Binucleata* zusammen.

4. Wash well ~~[illegible]~~ 2 thoroughly in water for [illegible]? Then reduce for 24 hours at [illegible] in [illegible] sealed bottle in Van Ermengems reducer - Wash well in water - [illegible] for 1 hour in 50% alc at 55 - [illegible] to alcohol chloroform [illegible] - Cut -

This gave best staining spiros in the context on Σ [illegible] March 1926.

	40 cc	20 cc
Silver	0.6	0.3
Water	20.0	10.0
[illegible]	20.0	10.0
[illegible]	2 days	1 day

Later. Spirochaetes [illegible]

Deckglas mit einem Tropfen flüssigen Paraffins auf, so daß das Blut kaum mit der Luft in Berührung kommt.

Schaudinn benutzte auch die feuchte Kammer nach F. E. Schulze. Sie wird mit grünen Algen beschickt und zugedeckt in den Thermostaten (über 37°) gestellt. Heizbarer Objekttisch (nach Pfeiffer) ist zu empfehlen. Vitalfärbungen mit Methylenblau und Neutralrot bieten keine wesentlichen Vorteile.

Anfertigung von Dauerpräparaten. Ausstrichpräparate.

Man sticht mit einer ausgeglühten Nadel, Lanzette, neuen Feder oder mit einem Blutschnepper (bequem bei der Untersuchung der Kinder) in das Ohrläppchen oder die Fingerbeere, die vorher mit Alkoholäther gut gereinigt wurde, ein, läßt den ersten Blutstropfen abfließen und fängt den zweiten mit der Kante eines Deckgläschens oder mit einem dünnen Glasstab auf. Der Bluttropfen am Deckglasrand darf nicht zu groß sein. Dann setzt man das Deckgläschen in einem Winkel von 45° an einen gut gereinigten, entfetteten Objektträger an und verstreicht das Blut in einer möglichst dünnen Lage. Auch kann man statt des Objektträgers ein anderes Deckgläschen nehmen und die beiden Deckgläschen ohne Druck aneinander abziehen. Oder man berührt den vorquellenden Bluttropfen mit einem geraden, dünnen Glasstab, an dem das Blut entlangläuft. Hierauf wird mit der bestrichenen Seite des Stabes ein Ausstrich am Objektträger angefertigt. Christophers und Stephens bedienen sich hierzu einer ganz glatten, nicht zu oft ausgeglühten Nadel.

Nach Hořižka und Lenz (Wien. Klin. Wochensch. 1904) kann man den Bluttropfen mit dem Rande eines Zigarettenpapiers auffangen und dann mit ihm einen Objektträger entlangfahren. Durch die Adhäsion des feuchten Papiers an den Objektträger werden die Blutkörperchen in einer dünnen Schicht ausgebreitet.

Die lufttrockenen Präparate werden etwa 10 bis 15 Minuten im Alkohol absolut. fixiert. Oft wird auch eine Mischung von Alkohol (96proz.) und Äther zu gleichen Teilen angewendet.

Die fertigen Präparate sind möglichst trocken über Chlorkalzium aufzubewahren. Es ist darauf zu achten, daß sie besonders beim Transport nicht der Körperwärme und dem Schweiße ausgesetzt werden.

I. Für rasche Diagnosenstellung ist die einfache Färbung mit Mansons Methylenblaulösung zu empfehlen:

Stammlösung: 100 ccm Wasser (kochend),
Borax 5,0,
Methylenblau med. pur. Höchst 2,0.

Die Lösung wird so stark verdünnt, daß das Licht durchscheint. Man färbt bei frischen Präparaten etwa 10—15 Sekunden, bis das Präparat mattgrün ist.

Alte Präparate werden mit 1proz. Methylenblaulösung (+ 0,2proz. Soda) gefärbt, doch fällt bei sehr alten, aus den Tropen stammenden Präparaten die Färbung oft schlecht aus.

II. Meistens wurden die Malariapräparate nach der Methode von Romanowsy, die von Ziemann, Nocht, Laveran, Ruge, Maurer, Reuter, Leishmann, Wright mannigfach modifiziert worden ist, gefärbt. Hierzu stellt man sich zunächst zwei Stammlösungen her:

1. Eine 1proz. Methylenblaulösung (Methylenblau) med. pur. Höchst) mit 0,3—0,5proz. Soda. Sie muß längere Zeit reifen, d. h. etwa zwei Tage im Paraffinschrank bei 50—60° C oder acht Tage im Blutschrank bei 37° stehen, damit sich genug „Rot im Methylenblau" bildet.

Maurer stellte in den Tropen die Lösung auf zwei Tage in die Sonne und ließ sie dann etwa acht Tage vor dem Gebrauch im Zimmer stehen.

Zur Konservierung diente $^1/_4$proz. Formalin. Die Farblösung muß vor dem Gebrauch einen rotvioletten Schimmer besitzen.

2. Eine wässerige 1proz. Eosinlösung (echt französisch).

Bei der Färbung verfährt man dann folgendermaßen: Nocht (Zentralbl. f. Bakterialogie Bd. 25, 1899) gibt zu 1—2 ccm Wasser 2—3 Tropfen Eosin und setzt dann tropfenweise von dem Methylenblau so lange hinzu, bis nichts von dem Eosin zu sehen ist. Auf dieser Lösung läßt man die Präparate 5—10 Minuten schwimmen. Abspülen, trocknen, Zedernöl.

Ruge (Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann 1903) versetzt 10 ccm destill. Wassers in einem Erlenmeyerkolben mit 1 ccm der 1proz. alkalischen Methylenblaulösung und fügt mit einer graduierten Pipette tropfenweise unter beständigem Schütteln die 1proz. wässerige Eosinlösung hinzu, bis ein Niederschlag auftritt (also etwa 0,3—0,6 ccm Eosinlösung).

Die Ausstriche (Deckgläschen) legt man mit der bestrichenen Seite nach unten in die Farbenflotte und erwärmt mäßig über der Flamme eines Bunsenbrenners, bis sich ein metallisches Häutchen auf der Farbenflotte bildet.

Das Auftreten dieses Häutchens ist gleichsam das Signal für das Zustandekommen einer guten Chromatinfärbung. Hernach wird es mit dem Fließpapier entfernt, das Präparat im destill. Wasser gründlich abgespült, getrocknet und in Zedernöl eingeschlossen. Alte Präparate, die in der Lösung überfärbt werden, müssen mit verdünnter Essigsäure rasch differenziert werden (ein Tropfen Essigsäure auf ein Glas Wasser). Objektträgerausstriche werden am besten auf dem Färbetrog nach Mayer (Firma Lautenschläger) gefärbt. Diese Färbungen haben jetzt nur historisches Interesse.

Im allgemeinen färbt man jetzt meistens mit der fertigen käuflichen (Grübler) Giemsalösung (1 Tropfen auf 1 ccm Aq. dest. Färbung bis gegen 1 Stunde, abspülen mit scharfem Wasserstrahl, trocknen, Zedernöl). Falls aber kein gutes dest. Wasser zur Verfügung steht und der Farbstoff ausgefällt wird, wende man die alte Schaudinn-Hoffmannsche Methode p. 43 an.

Man kann auch nach der Methode von Ross einen großen Bluttropfen auf dem Objektträger eintrocknen lassen und dann ohne zu fixieren das Präparat bis zur völligen Lösung der Blutkörperchen in die oben erwähnte Eosinlösung hineinlegen. Erst nach dieser Prozedur wird fixiert und in der üblichen Weise nach Giemsa gefärbt.

Methode der nassen Konservierung.

Schaudinn (Studien über krankheitserregende Protozoen II Plasmodium vivax, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 19, Heft 2, 1902) empfiehlt die Fixierung mit Hermannscher Flüssigkeit:

1proz. Platinchlorid	15 Teile,
2proz. Osmiumsäure	4 Teile,
Essigsäure	1 Teil.

Einige Tropfen Blut läßt man direkt in ein Zentrifugiergläschen mit der erwähnten Fixierungsflüssigkeit hineinfallen, wäscht unter Zentrifugieren mit Aqua dest. aus, Wasser, setzt einige Tropfen Grenachers Hämatoxylin zu und untersucht nach einiger Zeit entweder im Wasser, Glyzerin oder essigsaurem Kali (gut für achromatische Strukturen) oder man bringt das Blut durch die Alkoholreihe in Xylol und Zedernöl.

Für die chromatischen Strukturen ist die oft erwähnte Sublimatalkoholfixierung geeigneter: $^1/_3$ Alkohol 90 % + $^2/_3$ Sublimat konzentr. (wässerig) im heißen

Zustande angewandt. Den oben angefertigten Blutausstrich läßt man rasch wagerecht auf das heiße Fixierungsgemisch auffallen. Waschen im Wasser, 60proz. Jodalkohol, Wasser, Färbung mit verdünntem Grenachers Hämatoxylin oder Heidenhains Eisenhämatoxylin (Beize 24 Stunden, ebenso lange Färbung, Tinktion fällt wegen des Hämoglobins selten gut aus, dagegen bei Hämosporidien der Kaltblütler zu empfehlen), Alkoholreihe, Xylol, Zedernöl.

Diese Methoden sind den trockenen Ausstrichmethoden insofern vorzuziehen, als die Kernstrukturen besser erhalten werden.

Gewebsstücke (Milz) werden in toto mit Sublimatalkohol (s. p. 54) oder mit Hermannscher Mischung fixiert (s. p. 54), Auswaschen, Alkoholreihe, Chloroform, Chloroformparaffin, Paraffineinbettung. Für die Färbung der Schnitte ist zu empfehlen: Hämalaun nach Mayer, Rawitz' Glyzerin-Alaun, Hämatein und Eisenhämatoxilin (pg. 25ff.) mit Eosin oder Bordeauxrotnachfärbung (Bordeauxrot ist in Spuren der zweiten Differenzierungsbeize zuzusetzen). —

Überträger der Malaria sind Anopheles. Für ihren Fang bedient man sich eines breiten Zylinderglases, das oben mit einem dicht schließenden, in der Mitte durchbohrten Korkpfropfen verschlossen ist. Durch die Öffnung wird ein niedriger Glas- oder besser Blechtrichter durchgesteckt, den man behutsam über die meist auf der Decke oder in einem schattigen Winkel sitzende Anophele stülpt und sie dann mit einem viereckigen Blechstück, das man rasch zwischen die Unterlage und den Trichterrand durchschiebt, in den Trichter hineinjagt; meist fliegt die Mücke auf und kommt so von selbst in das Zylinderglas, eventuell kann man durch geeignetes Schütteln sie dahin treiben. Auch kann man die Mücke beim Fang in eine breite Glasröhre, die an dem einen

Ende mit einem Gummischlauch und Ballon versehen ist, gleichsam hineinsaugen, indem man sich ihr mit dem freien Röhrenende vorsichtig nähert.

Für Transportzwecke sammelt man die Mücken in einem zweiten, größeren, trockenen Glasgefäß, das oben mit Gaze verschlossen ist. Auch kann man etwas Reisig hineinlegen. Nocht hat für den Fang besondere Fanggläser konstruiert (vgl. Handbuch der pathog. Mikroorganismen S. 285, I. Bd.). Ähnliche Gefäße sind von der Firma Lautenschläger, Berlin, Chausseestraße 92, zu beziehen.

Für Versuchszwecke ist ein viereckiger, mit Gaze überzogener Käfig zu empfehlen, in den man die Mücken hineinläßt. Er muß so groß sein, daß für Proteosoma- oder Halteridiumversuche ein anderer Käfig mit Sperlingen oder Käuzchen hineingesetzt werden kann. Auch muß man unter den Gazekäfig eine flache Schale mit Wasser setzen, damit die vollgesogenen Mückenweibchen Gelegenheit haben, die Eier abzulegen.

Schaudinn brachte in die Gazekäfige blühende Pflanzen und verschiedene feingeschnittene Früchte, die ab und zu durch eine Schale mit Himbeer- oder Kirschsaft ersetzt wurden. Er konnte Männchen und Weibchen bei dieser Fruchtnahrung über zwei Monate erhalten. Der Gazekäfig muß vorn einen gut schließbaren Ausschnitt zum Durchstecken des Armes eines Malariakranken für Versuchszwecke enthalten. In der Dämmerung saugen die Anophelenweibchen leicht. Tiere, die sich zur Überwinterung eingerichtet und bereits Fett „angesetzt" haben, muß man vor dem Saugen hungern und bei einer Temperatur von 24 bis 30° C (in die sie nach und nach zu bringen sind) ihr Fett aufzehren lassen. Die vollgesogenen Weibchen werden dann bei verschiedenen Temperaturen in eigenen gazeüberzogenen Gläsern gehalten und zum Zwecke

der Untersuchung zu verschiedenen Zeiten nach dem Saugakt getötet (Äther).

Bei Versuchen mit Proteosoma darf man die Culexmücken nicht an allzu stark infizierten Vögeln saugen lassen, da für die Mücken unter Umständen die Parasiten pathogen sind.

Bei der Präparation der Mücken, die man vorteilhaft auf einer schwarzen Unterlage vornimmt, verfährt man folgendermaßen: Beine und Flügel der mit Äther getöteten möglichst frischen Mücke werden abgeschnitten und die Mücke wird in einen großen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dann sticht man zum Zwecke der Fixierung mit einer Präpariernadel den Thorax an, während mit einer anderen, etwas abgestumpften Präpariernadel der letzte Abdominalring abgequetscht und langsam abgezogen wird. Es kommen zuerst die weißen Eierstöcke, dann ein weißlicher Strang — der Darm — mit dem Gewirre von malpighischen Gefäßen zum Vorschein. Das Herausziehen der Eingeweide muß vorsichtig geschehen, damit der Darm nicht frühzeitig durchreißt. Später trennt man den Thorax durch und bekommt so die oben genannten Organteile samt dem Magen frei. Für die ersten Stadien der Cystenbildung muß man den blutgefüllten Magen herauspräparieren. Sobald dieses geschehen ist, legt man das Organpräparat in einen großen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung und entfernt das überschüssige Blut durch vorsichtiges Quetschen und Auffallenlassen eines Deckgläschens auf den blutgefüllten, dunkeln Magen. Diese Prozedur muß man mehrmals wiederholen. Von dem ausgetretenen Blut können Ausstriche angefertigt werden.

Der Darm kann für Schnitte in Sublimatalkohol (s. S. 54) konserviert werden. Für Totalpräparate wird der Darm in der Leibeshöhlenflüssigkeit zerzupft, und das mit diesen Teilen bestrichene Deckglaspräparat

mit der Objektseite wagrecht auf die heiße Sublimatalkoholmischung fallen gelassen. Alles weitere vgl. S. 27. Für die Durchfärbung der Cysten eignet sich stark verdünntes Grenachers Hämatoxylin (käuflich bei Grübler). Den Grad der Färbung kontrolliert man am besten unter dem Mikroskop. Abspülen im Brunnenwasser, Alkoholreihe, Xylol, Zedernöl.

Totalpräparate von Mücken werden in Alkohol fixiert, in Glyzerin aufgehellt und mit Asphaltlack umrandet.

Für die Präparation der Speicheldrüsen trennt man mit dem Froschschen Messerchen den Dorsalteil des Thorax ab, luxiert den Kopf dorsalwärts, bis der Halsteil von dem restlichen Thorax, der mit einer Präpariernadel zu fixieren ist, abgetrennt wird. Bei dieser Operation bleiben die Speicheldrüsen an dem Halsteil hängen. Die Speicheldrüsen werden dann völlig frei unter dem Mikroskop herauspräpariert. Bei dieser Prozedur ist es angezeigt, die überschüssige Kochsalzlösung durch Fließpapier zu entfernen. Die ganze Speicheldrüse besteht aus zwei langen Seitenschläuchen und einem mittleren kürzeren Teil, der Giftlappen genannt wurde. Bei der letzten Präparation bediene man sich verschieden geschärfter oder mit einem Häkchen versehener Präpariernadeln. Eine binokuläre Präparierlupe mit Stützplatten leistet dabei gute Dienste.

Weiteres über die Präparation findet man in dem Artikel „Malariaparasiten“ von Ruge (Handbuch für pathogene Mikroorganismen von Kolle und Wassermann 1. Bd., 1903), und in Eysell, „Wie weist man Hämosporidien im Culicidenleibe nach“, Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. 1902, S. 160).

Schaudinn untersuchte die ersten Stadien der Sporogonie nur in der Körperflüssigkeit aus dem Abdomen von etwa 6—10 rasch vorher präparierten Anophelen (nicht Normalsalzwasser oder Eiweiß).

Für Schnitte müssen die in Sublimatalkohol konservierten, der Beine und Flügel beraubten Mücken an mehreren Stellen ihres Körpers Öffnungen zum Eintritt von Paraffin erhalten. Für Celloidinschnitte legt Eysell die Mücken in einen Einschnitt von Sonnenblumenmark und entfernt mit einem in Alkohol befeuchteten Messer einzelne oberflächliche Teile des Kopfes, Thorax und Abdomens.

Für besondere Experimente muß man die Culiciden und Anophelen selbst aus den Eiern züchten. Man läßt zu diesem Zwecke die blutgesogenen Weibchen in den Gazekäfigen ihre Eier an die Oberfläche der oben erwähnten Glasschale absetzen und sorgt für die Fütterung der ausgekrochenen Larven.

Nach Schaudinn sind die Anopheleslarven mehr Fleisch-, die Culexlarven mehr Pflanzenfresser. Anopheleslarven hält man in 10—15 cm breiten, 4—5 cm tiefen, mit Algen besetzten Glasschalen zu etwa zwanzig Stück, filtriert für diese aus einer mit etwas Jauchewasser versetzten Cladoceren-(Wasserflöhe-)Kultur einige Dutzend Wasserflöhe ab, zerkleinert sie und streut sie auf die Oberfläche der Glasschalen. Auch junge Culexbrut kann in derselben Weise behandelt als Futtermittel dienen. Damit das Wasser nicht faulig wird, muß man es jeden dritten Tag wechseln (vgl. Kerschbaumer, Malaria, ihr Wesen, ihre Entstehung und ihre Verhütung. Wien, Braumüller 1901. Grassi, Die Malaria, Studien eines Zoologen, Jena Gustav Fischer 1901).

Die übrigen Hämosporidien werden in ähnlicher Weise untersucht. — Jedesmal muß man die Biologie des betreffenden Zwischenwirts genau studieren und diesen womöglich aus dem Ei züchten, da Doppel- und Mehrfachinfektionen der übertragenden Zwischenwerte vorkommen können, die dann das ohnehin verwickelte biologische Bild erheblich trüben. Dabei darf man

die Möglichkeit einer „vererbten" Infektion der Eier (Pebrine der Seidenraupen, Malaria, Halteridium, manche Herpetomonas und Crithidiaarten, Schildkrötenmalaria, Karyolysus, Piroplasmen, Spirochäten usw.) nicht außer acht lassen.

Unterordnung. Piroplasmen.

Die Piroplasmen des Blutes werden nach derselben Methode wie die Malariaplasmodien behandelt (alkalisches Methylenblau, Romanowsky-Giemsa-Färbung, Fixierung mit Sublimatalkohol oder mit Hermannscher Flüssigkeit, Nachfärbung mit Grenachers Hämatoxylin usw.). Besonders ist die nasse Fixierungsmethode mit Eisenhämatoxylinfärbung nach Breinl-Rosenbusch anzuraten (vgl. Tryp. S. 26, 34).

Nach Kossel sind auch basische Anilinfarbstoffe wie Methyl- und Gentianaviolett, ferner Hämatoxylin, weniger Fuchsin geeignet.

Kossel und Weber (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 17, 1900) fixierten die Ausstriche mit Alkohol absolut. und färbten mit alkalischer Methylenblaulösung.

R. Koch (Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 54. Bd., I. Heft, 1906) und Kleine färben die Parasiten nach der Methode von Giemsa, die für gewöhnliche Diagnosezwecke allein zu empfehlen ist.

Kleine (ebend. S. 13) konnte bestimmte Veränderungen an den Piroplasmaparasiten beobachten, sobald er das Blut junger, mit Hundepiroplasmen infizierter Hunde kurz vor dem Tode defibrinierte und damit etwa 20 sterilisierte Reagensgläser beschickte. Die Reagensgläser enthielten je 0,5 ccm physiologische Kochsalzlösung und 0,5 ccm Blut. Das so verdünnte Blut wird bei einer Temperatur von etwa 27° C gehalten. Nach etwa 18 Stunden gießt man die obere, klare Flüssigkeit

ab und findet in dem Bodensatz die von R. Koch beschriebenen eigenartigen Gebilde. Miyashima kultiviert Piroplasma parvum auf Blutbouillon (Philipp. Journ. of. Sci. II, 1907). Nuttall und Graham-Smith (Parasitalrgy 1908) kultivieren Piroplasma canis in 0,5 ccm Blut + 0,5 ccm von 0,6—0,8% Salzlösung.

Kala-azar.

Für Schnittfärbung empfiehlt sich eine Konservierung in Sublimatalkohol (s. 26, 54), Auswaschen in 60% Jodalkohol oder Flemming's Flüssigkeit; Färbung mit Saffranin oder Hämatoxylin-Eosin oder Fuchsin-Methylenblau. (Lit. Marchand und Ledingham, Zeitschr. f. Hygiene, 1904, 47. Bd. Sluka-Zarfl, Deut. Archiv f. klin. Med., 1909, 66. Bd.). Bei Milzpunktion empfiehlt Rogers, innerlich zur Beförderung der Blutgerinnung Calciumchlorid zu verabreichen, höchstens 1 ccm Blut aus der Milz zu entnehmen (Kompressionsverband). Ausstriche nach Art der Malaria, Fixierung im Alk. absolut. Färbung nach Giemsa (s. 43, 53).

Rogers (Lancet 1904, 5, 7) setzt zum Zwecke der Kultur zu dem Milzblut eine geringe Menge von 5% Natrium citricum und kultiviert bei 22° C. Nicolle (Archiv d. l. Inst. Pasteur de Tunis, 1908) verwendet mit mehr Erfolg folgenden Nährboden: Agar 14,0 g + Seesalz 6,0 g auf 900,0 ccm Wasser, dem $^1/_3$ defibriniertes Kaninchenblut zugesetzt wird. Keine Neutralisierung oder Alkalisierung; schräg erstarren; dann 2—3 h in 37°; um Verdunstung zu verhüten, oben mit Paraffin verschließen; im Dunkeln bei Zimmertemperatur züchten. Ausstriche nach Giemsa (s. 43, 53) färben. Rach und Zarfl (Deut. Archiv f. klin. Med. 1909) untersuchten die Kulturausstriche mit der Reichertschen Dunkelfeldbeleuchtung.

2. Ordnung. Koccidien.

Für Konservierung von Koccidien eignet sich besonders eine Mischung von zwei Teilen wässeriger konzentrierter Sublimatlösung und einem Teil absolut. Alkohol mit einem Zusatz von Eisessig (Schaudinn). Siedlecki fügt der Sublimatlösung 0,25proz. Essigsäure hinzu. Außerdem ist das Hermannsche Gemisch (15 Teile 1proz. Platinchloridlösung, 1 Teil Eisessig, 2 Teile (oder 4) 2proz. Osmiumsäure) oder starke Flemmingsche Gemisch (1proz. Chromsäure 15 Teile, 2proz. Osmiumsäure 4 Teile, 1 Teil Eisessig) für eine länger dauernde Fixierung der möglichst kleinen Stücke zu empfehlen (gründliches Auswaschen).

Für Deckglasausstriche ist die sogen. feuchte Methode anzuwenden, d. h. man läßt die feuchten, eben hergestellten Ausstriche horizontal auf das oben bezeichnete heiße Sublimatalkoholgemisch auffallen, wäscht nach einer halben Stunde im Wasser dann Jodalkohol (60proz.) aus und färbt nach Belieben mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, verdünntem Hämatoxylin von Grenacher usw. Moroff und Fiebiger tingierten die Ausstrichpräparate nach der Methode von Giemsa (vgl. Trypanosomen).

Nächst der Ausstrichmethode ist aber jedesmal die Schnittmethode und die Untersuchung des lebendigen Objektes anzuwenden. Im letzteren Falle untersucht Wasielewski (Sporozoenkunde, Jena 1896) die Parasiten entweder in ihrem natürlichen Medium oder in physiologischer Kochsalzlösung oder in einer Eiweißlösung, die aus 20 ccm Hühnereiweiß, 200 ccm Wasser und 1 g Kochsalz hergestellt wird.

Pianese (Arch. parasit. Paris, Tome 2, 1899. S. 412) fixiert die Leberkoccidien in einem Gemisch von 20 ccm 10proz. wässeriger Kobaltchloridlösung, 5 ccm

2proz. Osmiumsäurelösung und 1 Tropfen Ameisensäure. Auch die Fixierung mit Pikrinessigsäure (3 Teile konzent. Pikrinsäurelösung, 1 Teil Eisessig [Davidoff], Auswaschen gleich im 70proz. Alkohol) findet vielfach Anwendung.

Gefärbt wird mit Grenachers Hämatoxylin (1 ccm des käuflichen Farbstoffes v. Grübler [auch Alaunhämatoxylin genannt] auf 200 ccm Wasser), das man etwa 24 Stunden einwirken läßt und eventuell bei Überfärbung mit schwachem, salzsauerem Alkohol differenziert (Auswaschen im Brunnenwasser), 60° ammoniakalischen Alkohol, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam. Ferner werden die Koccidien mit Mayers Hämalaun (Siedlecki) oder Heidenhains Eisenhämotoxylin (pg. 25, 26) mit Bordeauxrotnachfärbung tingiert. Auch Säurefuchsinfärbungen sind in manchen Fällen geeignet; ferner Gentianaviolett und Vesuvin. Nach Fixierung mit Osmiumgemischen färbt man das Karyosom am besten mit Pikrokarmin oder Safranin. Hämatoxylinfärbungen sind mit Orange G und Eosinnachfärbungen zu kombinieren, wobei jedoch das Eosin in starker Lösung längere Zeit hindurch anzuwenden ist. (Vgl. Schaudinn, Untersuch. ü. d. Generationswechsel bei Koccidien. Zool. Jahrb., Abt. f. Morph. v. 13, 1900 und Arb. aus d. Kaiserl. Grundbuchamte 18, 3. Heft, 1902.) Zum Studium der Auswanderung und Schicksale der Sporozoiten empfiehlt es sich, die künstliche Infektion der Wirtstiere vorzunehmen. Die Sporozoiten der Leberkoccidien des Kaninchens schlüpfen unter Einfluß von Pancreatin depurat. von Dr. Grübler & Co., Leipzig (geringe Menge in 2—3 ccm Wasser mit Spur Sodazusatz) aus. Moroff (A. f. Protistenk. 06) mischte die reifen Cysten von *Adelea zonula*, die in den Larven von *Blaps mortisaga* lebt, zusammen mit dem Fettkörper und mit Kleie, zerrieb die Masse fein, feuchtete sie mit Wasser an und gab sie Larven, die 4—5 Tage

gehungert hatten, zu fressen. Vergleiche ferner die Untersuchungen Metzners im Archiv f. Protistenkunde 05.

3. Ordnung.. Gregarinen.

Die Art der Bewegung der Gregarinen wird zunächst in einem durch Karminpulver oder Tuschesuspension gefärbten Medium untersucht (Schleimproduktion, Gleiten). Für das Studium der Enschlüsse bedient man sich der Vitalfärbungen (Neutralrot, Brillantkresylblau) sowie einer wässerigen Lösung von Jodjodkalium (Glykogen) oder Methylviolett. Die Präparate werden in Laevulose oder Gummiglyzerin aufbewahrt.

Neben den mit Jodjodkali braungelb färbbaren Körnern, die Bütschli Paraglykogen nennt, und die bei Zusatz von verdünnter Schwefelsäure einen violetten Farbenton annehmen, gibt es noch sogen. karminophile Granula, die sich nach der Fixierung mit Pikrokarmin und Essigkarmin färben. Zum Fixieren der Gregarinen ist das oben bei den Koccidien erwähnte Sublimatalkoholgemisch (s. S. 61) sowie Pikrinessigsäure (S. 62) geeignet. Lo Bianco konserviert die Parasiten in Pikrinschwefelsäure (100 Teile Aqua dest. + 2 Teile konzent. Schwefelsäure mit Pikrinsäure gesättigt) eine Stunde lang und wäscht sofort mit 70proz. Alkohol mehrere Stunden aus, bis die gelbe Farbe aus dem Objekt verschwunden ist. Schellak (Arch. f. Protistenkunde, 9. Bd., 1907) präpariert die starken Cystenhüllen mit feinen Nadeln ab und fixiert (Duboscq und Brasil) mit: Pikrinsäure 1 g, Essigsäure 10 ccm, Formol (wässerige Handelslösung) 50 ccm, Alkohol 75% 150 ccm. Als Färbung der Ausstriche (nasse Methode) ist die Methode von Giemsa zu empfehlen, sonst sind als Färbungen Grenachers Hämatoxylin, Heidenhains Eisenhämatoxylin (Schnitte) mit Bordeauxrotnachfärbung, der Farbstoff wird in geringen

Spuren der Eisenalaunbeize zugesetzt, Safranin (nach der Fixierung mit Flemmings Gemisch) und Pikrokarmin geeignet. Totoobjekte färbt man mit Boraxkarmin. Als weitere Fixierungsmittel sind: Hermannsche Lösung (S. 61) und Flemmings Gemisch zu empfehlen (S. 61). Paehler (Archiv f. Protistenkunde 1904) fixierte mit heißem Sublimatalkohol (S. 61) und zwar setzte er zu 1 Teil konz. Sublimat (heiß) 1 Teil kalten Alkohol, beließ bei allen Prozeduren die Objekte kurze Zeit in den absoluten Flüssigkeiten und lange Zeit in den gemischten. Den Cysteninhalt kann man durch Zerpressen der Cyste freilegen und nach Art der nassen Ausstriche fixieren und färben. Für Schnitte ist Färbung nach Mallory zu empfehlen (S. 67, 68).

Für das Studium der Cuticula und ihrer Streifung leistet die Behandlung der Objekte mit Goldchlorid, Essigsäure, Ammoniakwasser und Höllenstein (Silbernitrat 1proz. verdünnt mit dem 2—4fachen Volumen Wasser im direkten Sonnenlichte behandelt) in vielen Fällen gute Dienste.

4. Ordnung. Myxosporidien.

Myxosporidien untersucht man zunächst im lebenden Zustande, indem man die Parasiten oder die parasitenhaltige Flüssigkeit unter ein mit Wachsfüßchen unterstütztes Deckglas bringt. Von dem mit Myxosporidien behafteten Gewebe stellt man Quetsch- oder Zupfpräparate her.

Für das Ausstoßen der Polfäden wird eine ganze Reihe von Reagentien angegeben: Soda, Potasche (direkt oder nach Eintrocknung der Sporen), Glyzerin, Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Essigsäure, Jodlösung, Aqua destillata, Verdauungssäfte des Wirtstieres (Thélohan: Recherches sur les Myxosporidies. Bull. sc. de la France et de la Belgique 1895). Auch

Fäulnisprozesse können das Herausschleudern der Polfäden bewirken, ebenso Druck (Bütschli: Bronn's Klassen und Ordnungen d. Tierreichs). Schuberg und Schröder (Archiv f. Protistenk. 05) ließen die Sporen auf einem Deckgläschen eintrocknen und wendeten dann Schwefelsäure oder Salpetersäure an. Auch nach 12—24stündigem Verweilen in Wasser wurden die Polfäden ausgeschleudert. M. Plehn konnte (Archiv f. Protistenkunde 05) das Ausschnellen durch dünne Alkalien, wie Kalkwasser, das auf die Hälfte verdünnt wurde, oder mit 1proz. Kali oder Natronlauge bewirken.

Stempel (Archiv f. Protistenkunde 04) ließ die Sporen von *Nosema anomalum* zur Darstellung des Polfadens nach Zusatz von Jodtinktur 24 Stunden in der feuchten Kammer liegen.

Von der Anwesenheit der Vakuole im Amöboidkeim kann man sich durch Zusatz von Alkohol, Osmiumsäure, schwacher Salpetersäure, 2proz. Silbernitrat überzeugen.

Durch Zusatz von alkoholischer Jodlösung oder Lugolscher Lösung werden die Vakuolen oft mahagonibraun gefärbt.

Trennung der die Spore zusammensetzenden Schalen wird bewirkt durch Potasche, Soda, Schwefelsäure, Salpetersäure, langen Aufenthalt im Wasser, Verdauungssäfte des Wirtstieres (Thélohan) und Fäulnis.

Deckglasausstriche von Sporenmaterial oder Entwicklungsstadien der Sporen läßt man trocknen (weniger zu empfehlen), fixiert in absolutem Alkohol und färbt nach der Methode von Giemsa, oder man fixiert auf „nassem Wege" mit $^2/_3$konz. wässriger Sublimatlösung + $^1/_3$ absolut. Alkohol (heiß), indem man die Präparate mit der Schichtseite auf das Gemisch horizontal auffallen läßt, wäscht mit 60proz. Jodalkohol aus und färbt mit verdünntem Grenacherschen Hämatoxylin (Grübler). Diese Methode ist besonders bei Ausstrichen aus mit Pebrine infizierten Seidenraupen zu empfehlen.

Ferner kommen die für Schnittpräparate angewendeten Fixierungsmittel in Betracht. Vgl. außerdem die neue Methode v. Giemsa pg. 34.

Für Schnitte fixiert man mit dem oben angeführten Sublimatalkoholgemisch, mit Flemmings (Thélohan) oder Hermanns Gemisch (beide zu empfehlen) (S. 24, 61), mit Kaliumbichromatessigsäure nach Tellyesniczky: Kaliumbichromat 3 g, Essigsäure 5 ccm, Wasser 100 ccm. Kleine Objekte bleiben darin 1—2 Tage, werden gut mit Wasser ausgewaschen und durch die Alkoholreihe von 15 Proz. an durchgeführt. Ferner kann man das Orthsche Gemisch (10 Teile Müllersche Flüssigkeit + 1 Teil Formol), Pikrinessigsäure und nach Doflein Pikrinschwefelsäure (1 ccm konz. Schwefelsäure auf 100 ccm gesättigter Pikrinsäurelösung in Wasser) anwenden. M. Plehn (Lentospora cerebralis) fixiert mit Formal-Sublimat-Eisessig nach Oppel.

Gute Färbungen werden mit Boraxkarmin, Gentianaviolett und Eosin, Hämatoxylin und Safranin (nach Flemmingschen und Hermannschen Gemisch) erzielt. Für Schnitte ist auch Heidenhains Eisenhämatoxylin mit Orangenachfärbung (Orange G) ratsam. Für Kernfärbungen behandelten Schuberg und Schröder die Cysten 2—3 Tage bei 56° C mit Boraxkarmin vor, betteten die Objekte ein und färbten die 3—5 μ dicken Schnitte mit Methylenblau oder Methylgrün nach. Schöne Färbungen erhielten sie bei Boraxkarminvorfärbung und Anwendung der von Blochmann modifizierten van Gieson'schen Färbung.

„Benutzt wurde eine 0,01 proz. Lösung von triphenylrosanilintrisulphosaurem Natrium in gesättigter, wässeriger Pikrinsäurelösung. Hierin wurden die Schnitte bis zu 12 Stunden belassen. Die Schale der Sporen färbte sich gelb, Sporoplasma und Polkapseln grün bei roter Kernfärbung" (Archiv f. Protistenkunde 6. Bd., 1905). Sehr differente Färbungen liefert die wichtige Methode

von Mallory. Die Paraffinschnitte (Xylol, Alkoholreihe, Wasser) kommen in $^1/_{10}$% Säurefuchsinlösung, dann 1% Phosphormolybdänsäure, dann in eine Lösung von Anilinblau (0,5%) + Orange G (2,0%) und Oxalsäure (2,0%) gelöst in destilliertem Wasser (5 Minuten Färbedauer) rasches Abspülen in Wasser, gleich 96% Alkohol, bald Alk. absolut., Xylol und Kanadabalsam. Färbung manchesmal launenhaft.

Die Färbung kann man eventuell ersparen, wenn man das nach Flemming oder Hermann fixierte Material direkt in rohen Holzessig oder in eine schwache Lösung von Pyrogallussäure bringt.

Für Infektionsversuche wird das Sporenmaterial, in Filtrierpapier eingewickelt, mit einer Schnur befestigt und einem Fisch zum Verschlucken gegeben. Vergleiche auch die Ausführungen von Thélohan. Für Infektionsversuche mit Pebrine genügt es, das Sporenmaterial mit einem Pinsel an frische Maulbeerblätter aufzutragen und diese nach dem Abtrocknen an junge Seidenraupen zu verfüttern.

5. Ordnung. Sarkosporidien.

Die sog. Sarkosporidien„sporen" werden am besten im Gewebssaft, in physiologischer Kochsalzlösung, in Eiweißlösung (Eiweiß 20, 1 g Kochsalz, Aqua dest. 180) oder im filtrierten menschlichen Speichel untersucht (ev. heizbarer Objekttisch).

Die trockenen Ausstriche der Sporen färbt man nach einer Fixierung mit Alkohol absolut (15 Minuten) nach der Methode von Giemsa oder mitMethylenviolett, Gentiana und Fuchsin (Kitt). Untersuchung in Lugolscher Lösung oder in Saponin (Membran) ist zu empfehlen.

Bei sarkosporidienkranken Tieren sind Blutuntersuchungen angezeigt, da nach van Eecke die „Sporen",

die neben dem Kern oft noch ein karyosomartiges Korn und eine Vakuole besitzen, „zu jeder Zeit bestehende Eigenbewegungen, welche zum Teil fortschreitende, andernteils rotierende und außerdem auch örtliche sind", ausführen. Es ist daher die Annahme nicht unberechtigt, daß diese Entwicklungsstadien in die Blutbahn übertreten und von da durch blutsaugende Insekten weiter verschleppt werden, falls sie nicht aktiv in den Darm einwandern.

Infizierte Muskeln werden mit Sublimatalkohol, ($^2/_3$ konz. wässerige Sublimatlösung + $^1/_3$ Alkohol absolut), mit Flemmings Gemisch (1proz. Chromsäure 15 Teile, 2proz. Osmiumsäure 4 Teile, Eisessig 1 Teil), Hermanns Gemisch (15 Teile 1proz. Platinchloridlösung, 1 Teil Eisessig, 4 Teile 2proz. Osmiumsäure) fixiert. Auch sind naß fixierte (Eisenhämatoxylinfärbung) oder trocken fixierte (Giemsafärbung) Ausstriche aus den Schläuchen anzuraten. Bei verkalkten Muskelschläuchen ist eine Konservierung mit dem Gemisch von Perényi, das sonst nicht besonders zu empfehlen ist, angezeigt (4 Teile 10proz. Salpetersäure, 3 Teile 90proz. Alkohol, drei Teile $^1/_2$proz. Chromsäurelösung).

Rieck härtet die Schläuche mit Alkohol oder mit Müller'scher Flüssigkeit: Kaliumbichromat 2—$2^1/_2$ g, Natriumsulfat 1 g, Wasser 100 ccm, Fixierung 1—2 Tage, gut in Wasser auswaschen, Alkoholreihe usw., färbt mit Hämatoxylin und dann mit Eosin nach und hellt die Schnitte in pikrinsäurehaltigem Nelkenöl auf. Nicolle färbt mit Karbolthionin: 100 g 1proz. Karbolwasser, 10 ccm gesättigte Lösung von Thionin in 5proz. Alkohol.

II. Stamm. Cytoidea.

Klasse Ciliata.

Infusorien kann man sich in größerer Menge durch das Anlegen von Infusionen aus Heu, Stroh, Pferdemist, Pflanzenblättern usw. beschaffen. Sogen. Paramaecienkulturen werden nach den Angaben von R. Hertwig in folgender Weise gewonnen: Teilstücke der Kiemen und des Fußes der Teichmuschel (Anodonta) werden ins Wasser gelegt, worauf sich nach einigen Tagen Paramäcien oben am Wasserrande ansammeln. Diese sammelt man mittelst einer gut gereinigten Pipette und überträgt sie in Zuchtgläser mit stark geschütteltem, altem, ausgefaultem Teichwasser, in das an einer Schnur ein Gazebeutelchen mit zerkleinerten Salatblättern hineingehängt wird. Bald entwickeln sich zahlreiche Fäulnisbakterien, die den Paramäcien zur Nahrung dienen. Die Salatblätter muß man öfters wechseln. Colpidien„kulturen" gewinnt man aus Heuinfusionen, indem man hernach die Protisten in einen aufgekochten Blätteraufguß bringt. Kulturen von einem Individuum aus legt man in der Weise an, daß man sich entsprechende Verdünnungen aus dem Infusorienwasser anfertigt, mittels Kapillarröhrchen wenige Protozoen herausfängt, ihre Zahl in einem ausgehöhlten Objektträger feststellt, nach einer abermaligen Verdünnung die Prozedur wiederholt, bis es gelungen ist, ein Protozoon zu isolieren, das man mit den entsprechenden Bakterien in einer „Reinkultur" weiterzüchtet.

Die Vermehrung der Infusorien geht in diesen Kulturen nicht ins Unbegrenzte, es tritt nach einiger Zeit eine Periode der Depression ein (R. Hertwig, Calkins, Kulagin, Statkewitsch u. a.). Die De-

pressionszustände werden durch Wechseln der Flüssigkeit, Bewegung (Calkins), Zusatz von Fleischextrakt, Temperaturänderungen usw. behoben. Statkewitsch (Archiv f. Protistenkunde, 5. Bd., 1905) belebte die Kulturen durch sukzessive Durchspülungen, durch mechanisches Umrühren, durch allmähliche Neutralisation der Kulturen durch kohlensaures Natron und durch Zusatz von sehr geringen Quantitäten von phosphorsaurem Kalzium.

Für besondere Zwecke, wie für das Studium der Teilungsgeschwindigkeit, der Depression, des Alterns der Protozoen u. a. züchtet R. Hertwig die Infusorien (Dileptus, Stentor, Stylonychia- und Aktinosphärium) in kleinen Uhrschälchen mit ebenem Boden, die mittels Vaseline übereinander gut zugekittet werden und in die je ein Infusor, das mit einer sehr feinen Kapillarpipette herausgefangen wurde, hineingebracht wird.

Um die Geschwindigkeit der Ortsveränderungen der Ciliaten herabzusetzen, bedient man sich nach dem Vorschlag von E. Stahl und Jensen der Gelatine.

K. Ludolff setzte einigen Tropfen der Infusorienflüssigkeit zu diesem Zwecke etwas von 3proz. Gelatinelösung hinzu. Die Gelatine muß aber vorher erwärmt werden, auch kann man eine gleichmäßige Mischung beider Medien nur schwer erzielen. Statkewitsch züchtete daher die Infusorien direkt in schleimig-kolloidalen Medien (Medium syrupoidale et colloidale), wobei die Bewegungstätigkeit der fraglichen Mikroorganismen herabgesetzt worden ist. Auf den Boden eines breiten Probiergläschens streut man zu diesem Zwecke Semen Psyllii 1—2 cm hoch und gießt darüber 5—8—10 ccm Kulturflüssigkeit mit den Protisten auf.

Unter den verschiedensten Versuchsbedingungen ist aber Alga caragaheen als Zusatz besonders geeignet. Alga Caragaheen wird in reinen, weichen Marlensäckchen

in die Kulturflüssigkeit hineingehängt, worauf die schleimige Substanz in das Wasser hineindiffundiert.

Das Untersuchungsmedium erhält ferner durch Zusatz von Semen Cydoniae und Gummi Tragacanthae nach einiger Zeit eine ziemlich steife Konsistenz. Weniger geeignet ist Gummi cerasi und Gummi arabicum.

Schließlich ist hier Agar-Agar (Tjien-Tjien) zu erwähnen. Es werden davon 3—7 g in Stangen von 8 bis 10 cm Länge zerkleinert, worauf darüber ein Aufguß von 100—200 ccm Wasser, dem kohlensaures Natron oder phosphorsaures Kalzium hinzugefügt worden ist, kommt.

Für das Studium der Art der Wimperbewegung eignen sich Suspensionen von Tusche, die neuerdings Buri für verschiedene Mikroorganismen empfiehlt, Indigokarmin (Ehrenberg), Kohle, Lycopodium usw. Durch die Methode der Vitalfärbung (Neutralrot, Methylenblau, Brillantkresylblau) kann zunächst die Art und der Verlauf der Verdauung untersucht werden (mit Neutralrot sauer-kirschrot, alkalisch-gelbrot, ferner kann in manchen Fällen (z. B. bei alkalischer Reaktion des Mediums, Kalkwasser, Lithiumkarbonat) eine Tinktion des Kernes erzielt werden, außerdem färben sich verschiedene Granulationen (Fermentträger und Nirenstein) mit Neutralrot, weniger gut oder gar nicht mit Methylenblau. Schließlich kann durch das Neutralrot der Grad der Vitalität der verschiedenen Organoide der Zelle sowie das Eintreten des Zelltodes festgestellt werden, indem sich die gefärbten Einschlüsse bei den postmortalen Reduktionen entfärben.

Für die Feststellung der Reaktionen bei der Verdauung ist auch Lackmuspulver und Kongorot geeignet.

Einzelne Infusorien fixiert man unter dem Deckglas, indem man rasch die Fixierungsflüssigkeit von der einen Seite des Präparates hinzutreten läßt und gleichzeitig von der anderen Seite mit Wollfäden oder

Fließpapierstreifen absaugt. Es ist jedoch darauf zu achten, daß bei allen diesen Manipulationen das Objekt nicht trocken wird. Steht eine größere Menge von Ciliaten zur Verfügung, so bedient man sich der sogen. Massenmethode, indem man die Protisten in einem Zentrifugenröhrchen konserviert, auswäscht und färbt.

Die Ciliaten werden mit folgenden Konservierungsflüssigkeiten fixiert:

1. Konzentrierte Pikrinsäure (Pfitzner) oder Pikrinessigsäure (Thon) (3 Teile Pikrinsäure + 1 Teil Eisessig). Fixieren 12—20 Stunden. Auswaschen im 70proz. Alkohol.

2. 1proz. Osmiumsäure wird zu dem Infusionswasser zugesetzt (Korschelt). Certes fixiert mit 2proz. Osmiumsäure. Weniger zu empfehlen.

3. Einige Minuten langes Fixieren mit einer $^1/_3$proz. wässerigen Chlorpalladiumlösung (Cattaneo, Journ. R. Micr. Soc., London 1885, p. 538). Selten angewandt.

4. Lo Bianco konserviert Vorticellen mit heißer Sublimatlösung, Acineten mit Sublimat im Seewasser oder mit Osmiumsäure.

5. Fabre-Domerque fixiert mit einer konzentrierten Lösung von Osmiumsäure, bettet in Paraffin ein und schneidet jedesmal ein einziges, mit Pikrokarmin vorgefärbtes Tier.

6. Balbiani fixiert *Loxophylum* mit $^1/_2$—1proz. Osmiumsäure, färbt mit Methylgrün und Eisessigsäure, fügt unter dem Deckglas 1—2 Tropfen Ammoniak auf 20 ccm Wasser hinzu und wäscht es mit in Wasser gelöstem Methylgrün aus. Selten angew.

7. Hoyer fixiert *Copidium* mit 1 Teil 5proz. Sublimatlösung und 2 Teilen 3proz. Kaliumbichromatlösung eine Stunde lang.

8. Stylonychia kann man mit Perényischer Flüssigkeit (4 Teile 10proz. Salpetersäure, 3 Teile 90proz.

Alkohol und 3 Teile $^1/_2$proz. Chromsäurelösung) fixieren, wobei sich die krystallinischen Einlagerungen lösen.

9. Viele Infusorien fixiert man mit Vorteil mit dem Gemisch vom Rath (Anat. Anzeiger, 11. Bd., 1895, S. 289): 100 ccm gesättigte Lösung von Pikrinsäure, 6 ccm 2proz. Osmiumsäure, 1 ccm Eisessig (Auswaschen in Alkohol) oder mit Sublimatalkohol ($^2/_3$ konz. wässeriges Sublimat + $^1/_3$ 90proz. Alkohol) oder mit Flemmings Gemisch (1proz. Chromsäure 15 Teile, 2proz. Osmiumsäure 4 Teile, Eisessig 1 Teil).

10. Mit Erfolg fixierte Entz (Arch. f. Prot., 15. Bd., 1909) *Tintinniden:* a) mit Seewasser angefertigter, heißer, konzentrierter Sublimatalkohollösung, b) mit heißem konz. (40 %) Formol, c) mit heißem starken Flemmingschen Gemisch. Technik der Einbettung s. d. — 11. *Balantidien* werden mit Sublimatalkohol (S. 26) wie Dysenterieamöben fixiert und gefärbt. Flemming'sches Gemisch (S. 24), Schnellfärbung, Hämatoxylinfärbung, Eosin nachfärben. Heidenhains Eisenhämatoxylin (S. 25, 26). (Bezzenberger, Arch. f. Prot., 1903/04.)

Die Infusorien werden nach der S. 25 angegebenen Methode in Paraffin eingebettet und geschnitten.

Die Schnitte färbt man mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (S. 26) mit Bordeauxrot- oder Rubin S.-Nachfärbung oder nach Thon (Arch. f. Protistenkunde, 5. Bd., 1905) mit der Malloryschen Methode (S. 67, 68). Die Methode ist manchmal etwas launenhaft und wenig dauerhaft. Die Nukleolarsubstanzen werden gelb, orange oder rot gefärbt. In den einzelnen Farbmischungen bleiben die Schnitte etwa 2 Minuten. Die Phosphormolybdänsäure muß gut ausgewaschen werden.

Gonder färbte die in Cephalopoden schmarotzenden Infusorien (Arch. f. Protistenkunde, 5. Bd., 1905), die mit Osmiumdampf, Hermann'scher, Flemming'scher Lösung oder Sublimatalkohol ($^2/_3$ konz. Sublimatlösung + $^1/_3$ absolutem oder 70proz. Alkohol) fixiert wurden, mit Borax-

karmin (Grüblersche Tabletten, die in $^1/_2$ Teil Wasser (heiß) und in $^1/_2$ Teil 50proz. Alkohol, gelöst wurden), ferner mit Pikrokarmin und Mayers Hämalaun oder Delafields Hämatoxylin. Die Objekte werden in eine stark verdünnte Lösung über 24—48 Stunden gebracht, rasch mit salzsaurem Alkohol differenziert, mit Brunnenwasser ausgewaschen, Alkoholreihe, Nelkenöl, Kanadabalsam. —

Auch werden Infusorien einzeln isoliert und in Zedernöl oder Nelkenöl untersucht. Die genannten Öle hellen sie schön auf und man kann sie unter dem mit einem feinen Haar gestützten Deckgläschen von allen Seiten untersuchen.

Totopräparate von Infusorien werden auch mit Beale'schen Ammoniakkarmin und Alaunkarmin, das kaum überfärbt, gefärbt.

Zur Darstellung der Cilien werden verschiedene Methoden angegeben. Fol fixierte Tintinnen mit Eisenchlorid (in Alkohol von 60 Proz. verdünnt mit Wasser auf etwa 2 Proz.), wusch zunächst mit neutralem, dann um das Eisensalz hinwegzuschaffen, mit angesäuertem 70proz. Alkohol aus, und färbte mit Gerbsäure. Zur Darstellung der Wimperapparate färbte Maier (Archiv f. Protistenkunde, 1903) nach Konservierung in kaltem Sublimatalkohol mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, Nachfärbung in Bordeauxrot-R.

A. Schuberg (Archiv für Protistenkunde, 6. Bd., 1905) bringt zu dem gleichen Zwecke die Infusorien in einem kleinen Tropfen in ein größeres Uhrschälchen und übergießt sie mit einer Mischung von 5 Teilen 2proz. Kaliumbichromatlösung und 1 Teil 1proz. Osmiumsäure. Das Gemisch wird ordentlich durch mehrmaliges Aufsaugen mittels einer Pipette mit Gummihütchen durchgemischt, dann kommen die Infusorien mit wenig Flüssigkeit in eine verdünnte Silbernitratlösung und schließlich in eine 1proz. Silbernitratlösung, wo sie wiederum mit der Pipette durchgewirbelt werden.

Sodann werden die Protisten in einer größeren Menge destillierten Wassers gewaschen und durch die Alkoholreihe in Nelkenöl übertragen. Durch Klopfen auf das Deckgläschen werden einzelne Teile abgesprengt und auf die Insertion der Cilien usw. untersucht.

Auch können die Cilien nach der Methode von Löffler (S. 31) dargestellt werden. Als Beize nimmt man Tannin-Eisenalaun-Wollschwarz, ein Gemisch, das unter dem Namen Löfflers Geißelbeize (10 ccm von 20 g Tannin in 80 ccm Aqua dest. + 5 ccm gesättigte Lösung von Eisenoxydulammoniumsulfat + alkohol. Lösung Wollschwarz) käuflich ist, und färbt mit Anilinwasser-Fuchsin nach, nur daß man im Gegensatz zu der bakteriologischen Methode die ganze Färbung stets auf nassem Wege ausführt und ein Erhitzen der Beize sowie der Färbeflüssigkeit übergeht, dafür aber beide mindestens eine halbe Stunde einwirken läßt. Nach der Alkoholreihe wird in diesem Falle zum Aufhellen statt Nelkenöl Xylol genommen.

Anhang:

Chlamydozoa.

I. Variola-Vaccine.

Vaccinevirus ist durch Berkefeldfilter V filtrierbar (Negri. Gazz. med. ital. 1905).

1. 20 g frischen Pockendetritus verdünnt man mit 200—250 ccm sterilem dest. Wasser, zerreibt in einem Mörser und bewahrt im Kühlraum 2—3 Tage. Weiteres Reiben 3—4 Stunden Reibmaschine; Aufbewahren im Kühlraum 12—16 Tage, jeden Tag schütteln (10—15 Minuten); filtrieren durch Watte, Filterpapier und

schließlich durch Berkefeldkerzen V. Vereinfachung der Methode möglich, Abnahme der positiven Impfwirkung. Ferner Filtration durch Berkefeld N und Silberschmidtkerzen.

2. Anreicherung des Virus. Das derart verdünnte Material filtriert man durch Kolloidschichten, die es zurückhalten und anreichern. In einem kleinen Glastrichter wird mittels eines perforierten Platinkonus ein Filterpapiertrichter (benetzt) dicht eingefügt und mit 3% Agar übergossen (2—3mal unter gleichmäßiger Rotation wiederholen), so daß eine gleichmäßige, die Ränder des Papiertrichters überragende Agarschichte entsteht. Filtration unter Kontrolle bei mäßigem Druck in 2—4 Stunden. Ausstriche des hauchartigen Belages aus der Tiefe des Agartrichters. Sorgfältiges Trocknen, einlegen in destilliertes Wasser, Trocknen, längere Fixation mit Alkohol absolut. Färbung nach Löffler (S. 31), Giemsa (S. 33, 34), Thionin. Gramm negativ. Diese Filtration genügt für morpholog. Zwecke, sonst muß man mit Uhlenhutfiltern, die mit Kolloiden ausgegossen werden, arbeiten.

Für morphologische Zwecke empfiehlt sich in allen Fällen die Verimpfung des Virus auf die Kaninchenkornea. Strichelung derselben mit einer Nadel, Impflanzette oder Impffeder, oder Anlegen einer Epitheltasche mit schief gehaltener Lanzette, Einbringen des Virus (Filtrat größere Mengen) oder Vaccinelymphe. Falls Streptokokken bei dem Variola virus vorhanden sind, treten grobe Defekte auf. In seltenen Fällen treten bereits nach 3 Stunden sehr spärliche Guarnierische Körperchen neben dem Kern auf. Reichlich ist die Ausbeute am 2.—4. Tage. Guarnierische Körperchen treten auch im Brutschrank in ausgeschnittenen Kaninchenkornea auf.

Empfehlenswerte Methode für das Studium der Guarnierischen Körper:

a) Klatschmethode nach Sticker-Ewing (Arndt, Paschen). Abtupfen (Klatschen) der Kornea mit Deckglas oder Objektträger, trocknen, Alkoholfixierung, Färbung nach Giemsa (S. 33, 34) oder nasse Fixierung mit Sublimatalkohol (S. 26), Färbung mit Heidenhains Eisenhämatoxylin oder Methode nach Breinl-Hartmann.

b) Herausschneiden der Augen und Fixierung der Kornea mit Sublimatalkohol (S. 26) oder Flemmingsche (S. 24), Zenkersche (S. 25) Flüssigkeit, Auswaschen, Alkoholreihe, Einbettung in Paraffin, Aufkleben der Schnitte mit Aqua destillata, färben mit a) Hämatoxylin (Böhmer, Delafield), nachfärben mit Eosin, b) Heidenhains Eisenhämatoxylin (S. 26), c) Mallorys Gemisch (S. 68), d) Pikrokarmin oder Alaunkarmin, e) Ehrlich-Biondis Gemisch (sehr zu empfehlen), f) färben mit Gentianaviolett, rasche Alkoholdifferenzierung, Nachbehandlung mit Grams Lösung (Solve Jodi 1,0, Kal. jodat. 2,0 in Aq. dest. 5,0 nach Lösung adde Aq. dest. 295,0) 2 Minuten, g) Färbung nach Flemming: 2 Tage in alkoholischer Lösung von Safranin, rasch differenzieren $^1/_2$ Stuunde wässerige Gentianaviolettlösung, 20 Minuten konzentrierte Orangelösung, Alkoholreihe, Nelkenöl, Kanadabalsam.

h) Färbung nach Giemsa. 12—24 Stunden, Wasser, leichtes Abtupfen mit Fließpapier, rasch 90 % Alkohol, Azeton, Xylol, Kanadabalsam. In alten Präparaten Initialkörper. Ferner die neue Methode von Giemsa pg. 34. Differenzieren in 60% Azeton.

i) Färbungen mit Methylgrün, Dahlia, Gentiana, Thionin, Viktoriablau. Nachbehandlung nach Rawitz-Schuberg: längeres Auswaschen in dest. Wasser, rasche 40 % Alkoholdifferenzierung, Wasser, Tanninlösung 10:50 zirka 10 Minuten, Auswaschen, 1 % Tartarus stipitatus Wasser, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam, Initialkörper.

Darstellung des Vaccineerregers: Aus verschiedenen

INCLUSION

...es. I got best fixation of inclusions in sections of fresh Hodgkin glands by fixation in absolute alcohol - but it shrinks the tissue if left in it, so transferred the piece soon to 50% abs for overnight. M.H.G.

N.B. Goffi always insisted on fixing tissues in absolute when bacteria were to be stained in it, as formalin tends to prevent their taking the stain later.

Zeiten Klatschpräparate, sorgfältig Trocknen, Einlegen in Aqua destillata (Paschen), Trocknen, längere Fixierung in Alkohol absolut. Färbung nach Löffler. Anfangs größere Vaccineerreger (Paschen), später kleinere Körperchen.

Variolaschnitte kann man auch nach der Methode von Levaditi behandeln (Paschen) (S. 46, 47).

Mayer und Keysselitz (Beiheft z. Archiv f. Schiffs- u. Tropenkrankheiten, 1909) färbten Schnitte am inneren Organe mit Borrels Gemisch: Konz. wässerige Lösung von Magentarot, darauf Gemisch gleicher Teile konz. wässerig. Pikrinsäurelösung + wässerige Indigokarminlösung.

Varicellenmaterial fixierten Keysselitz und Mayer (Archiv f. Protistenkunde, 1908) mit Sublimatalkohol (s. 26), Flemmings und Hermanns Gemisch (s. 24), Färbungen mit Magentarot, Orcein, Ehrlichs Hämatoxylin mit Eosinnachfärbung, Eisenhämatoxylin (s. 25, 26), Giemsas Gemisch (s. 43).

Für Untersuchung frischer Klatschpräparate empfiehlt Volpino die Dunkelfeldbeleuchtung.

II. Tollwut (Lyssa).

Für die Tollwut sind die Negri'schen Körperchen charakteristisch, für deren Darstellung zahlreiche Methoden ausgearbeitet worden sind (vgl. A. Bohne, Zeit. f. Infektionskrank. usw. der Haustiere, Ostertag, 2. Bd.).

a) Negri fixiert Stückchen vom Ammonshorn in Zenkerscher Flüssigkeit (pg. 25), Einbettung in Paraffin, Färbung nach Mann (1% wässerige Eosinlösung 35 ccm, 1% wässerige Methylblaulösung 35 ccm, Aqua dest. 100 ccm) 24 Stunden. Abspülen in Wasser, Alk. absolut., dann Alkohol absolut. mit Zusatz von Natronlauge (30 ccm Alkohol absolut. 5 Tropfen einer 1% Lösung von Natronlauge in Alk. abs.) wieder mehrmals Abspülen in

Alk. absolut., Xylol, Kanadabalsam. Außerdem fixierte Negri noch mit einer Mischung von gleichen Teilen einer gesättigten Sublimatlösung und Alkohol, Färbung mit saurem Hämatoxylin nach Ehrlich.

b) Bertarelli fixiert das Ammonshorn in 10% Formalin 2 Stunden, Schneiden mit Gefriermikrotom, Antrocknen im Brutschrank bei 37°, Färbung nach Romanowski oder Giemsa (s. 43, 34).

c) Volpino färbt 24 Stunden mit Pikrokarmin, Wasser. Verdünnte Methylenblaulösung bis zur starken Blaufärbung, Wasser, Differenzieren in pikrinsaurem Alkohol.

d) Methode von Bohne und Lentz: 2—3 mm dicke Querscheiben des Ammonshorns werden 1 Stunde in Azeton bei 37° C gehärtet, dann $1^1/_2$ Stunde Paraffin (Schmelzpunkt 55° C), dann Paraffinschrank von 58° C, Einbetten, Schneiden, Ankleben mit Wasser, Xylol, Alkohol. Färbung: 1 Minute: Eosin extra B-Höchst 0,5 + 60% Äthylalkohol 100,0; Wasser; Färben 1 Minute: Gesättigte alkohol. Methylenblaulösung B-Patent Höchst 30,0 + 0,01% Kalilauge 100,0; Wasser; leichtes Abtupfen mit Fließpapier; Differenzieren in alkalischen Alkohol bis zur schwachen Eosinfärbung, dann Differenzieren in saurem Alkohol (1 Tropfen 50% Essigsäure auf 30,0), bis die Ganglienzüge eben noch als blaue Linien sichtbar sind; kurzes Abspülen in Alk. absolut. Xylol, Kanadabalsam.

Oder man färbt in derselben Weise und beizt nach Agalli mit Lugolscher Lösung: Jod 1,0 + Kal. jodat 2,0 + Aqua dest. ad 300,0 1 Minute; Wasser; Differenzieren in Methylalkohol, bis das Präparat ganz rot ist; Wasser; Nachfärben mit Methylenblaulösung $^1/_2$ Minute; Wasser; leicht abtupfen usw. wie oben.

e) Harris (Journ. of infect. diseases 5) fixiert Ausstriche in Methylalkohol 1 Minute, Wasser, Ein-

tauchen in alte gesättigte alk. Eosinlösung (1—3 Minuten), 2—3 Sekunden waschen, Eintauchen in eine Lösung von frischem Unnas alkalischem Methylenblau 5—15 Sekunden Wasser, Entfärben in 95% Alkohol, absolut. Alk., Xylol, Zedernöl.

Es empfiehlt sich für Quetschpräparate einen Ammonshornquerschnitt zwischen 2 Objektträgern zu zerquetschen, die Ausstriche in Methylalkohol zu fixieren, in Alk. absolut. abspülen und wie oben zu färben.

Färbung von Klatschpräparaten nach Giemsa (s. 43). Die kleinsten Körperchen färbt Babes (Zeit. f. Hygiene u. Infektionskrank., 1907, 56. Bd.) nach Ramon y Cajal (od. Levaditi) und nach Giemsa (s. 43). J. Koch färbte d. G. mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (2. Tag. d. deutschen tropenmed. Gesellschaft, 1909).

III. Trachom.

Abstriche der Konjunktiva mit einem dickeren Deckgläschen; Ausstriche nach Art der Malaria, lufttrocknen; Alkohol absolut.; Färbung mit Eosin, Azur I und II [falls kein gutes dest. Wasser in den Tropen vorhanden] (s. 43), Giemsas Eosinazur (s. 43) oder Methylenblau $^1/_2$ Stunde oder Karbolfuchsin.

Klatschpräparate lufttrocknen; Einlegen in Aqua dest. $^1/_2$ Stunde und mehr; trocknen in senkrechter Lage; Alkohol absolut. fixieren; Färbung nach Löffler (s. pg. 31).

Leber-Hartmann fixieren nach der nassen Methode mit Sublimatalkohol und färben mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain oder Eisenhämatoxylin nach Breinl-Hartmann (pg. 25, 26). Präparate dürfen nie trocken werden.

Di Santo (Archiv f. Augenheilkunde, LXI. Bd.,

1908) färbte alkoholgehärtete Follikelschnitte nach Giemsa (s. 43, 34) 4—5 Stunden; und wusch in Alkohol 3—8 Minuten aus; Zedernöl. Es ist fraglich, ob alle die beschriebenen Gebilde mit dem Trachomerreger etwas zu tun haben.

Herzog (Deutsche med. Wochenschrift 1909) färbt mit Sublimat (3% + 3% Eisessig 50° C) fixierte Schnitte 2—3 Tage mit zur Hälfte verdünntem Hämatoxylin Weigert und differenziert mit 30% Essigsäure.

IV. Hühnerpest.

Das Blut ist nach Ruß noch in Verdünnungen 1:1000 Millionen infektionsfähig, es passiert Chamberland-Berkefeld- und Pukalfilter; überschichtet man außen die Pukalfilter mit 3% Agarlösung und filtriert nach Abkühlung unter Benutzung eines Körting'schen Wasserstrahlgebläßes bei einem Vakuum von zirka 20 mm, so wird das Virus zurückgehalten. Mittels der oben beschriebenen Ultrafiltrationsmethode konnte in einigen Fällen in nach Löffler gefärbten Präparaten kleinste Körnchen eben nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Körperchen ist sehr schwer. In Tupfpräparaten aus dem Vorderhirn, Wurm und Nachhirn der Hühner wurden eigenartige 1—$1^1/_2$ μ große Körperchen nach der Methode von Giemsa gefärbt (Münch. med. Wochenschrift, 1908).

Im Gehirn der Gänse fanden Kleine (Zeitschr. f. Hyg., 1905) und Schiffmann (Wiener klinische Wochenschrift, 1906) typische Einschlüsse; Fixierung mit Alkohol und Zenkerscher Flüssigkeit (pg. 26), Färbung mit Hämalaun-Eosin, Trinid. Mann'schen Gemisch (s. pg. 79) und mit Pyronin-Methylgrün nach Pappenheim.

WELLCOME LIBRARY INSTITUTE

V. Gelbsucht der Seidenraupe und Nonne.

Diagnostisch wichtig sind die intranuklear entstehenden Proteinkristalloide — polyedrischen Körperchen; sie färben sich mit Jodlösungen gelb, mit Millon's Reagens (Quecksilber 10 g; rauchende Salpetersäure 10 ccm, Wasser 20 ccm) rötlich, mit Zucker und Schwefelsäure morgenrot, mit 5 % Säurefuchsin violett, mit Giemsas Eosinazur je nach ihrer Entwicklung violett und blaurot, mit Löfflers Beize und Anilinfuchsin (s. pg. 31) rot, ferner färben sie sich nach Bolle (Seidenbau in Japan, Hartlebens Verlag, 1899) mit Fuchsin, Eosin, Erythrosin, Methylgrün, Meteorblau, Gentianablau, Methylviolett; mit Brillantkresylblau werden sie bläulich. Pikrinsäure färbt sie gelb, bei Pepsinsalzsäurezusatz verschwinden sie nach einiger Zeit (32° C). Ausstriche werden mit Sublimatalkohol ($^2/_3$ konz. Sublimat + $^1/_3$ 90 % Alkohol) 10 Minuten fixiert, Wasser, 60 % Jodalkohol, 60 % Alkohol, Aqua dest. Färbung mit verdünntem Grenacherschen Hämatoxylin (eventuell mit salzsaurem Alkohol differenzieren) Brunnenwasser, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam. Wahl färbt Schnitte mit Eisenhämatoxylin mit Bordeauxrotnachfärbung.

Am Rande von Ausstrichpräparaten (nasse Fixierung s. oben) wurden kleine Körperchen beobachtet, sofern man zuerst mit Grenachers Hämatoxylin und dann mit Giemsas Eosinazur färbt (Archiv f. Protistenkunde, 1907).

Mittels der Methode der sog. Ultrafiltration (s. 76) konnten ähnliche Körperchen neben den Polyedern und Detritus nachgewiesen werden. In den Leukozyten kommen rötliche Einschlüsse vor (Giemsas Eosinazur).

Über die Polyederkrankheit der Nonne (Lymantria monacha L.) vgl. B. Wahl, „Zentralblatt f. d. gesamte Forstwesen", 1909.

VI. Molluscum contagiosum..

Um die Darstellung der Körperchen hat sich besonders Lipschütz (Dermatolog. Zeitschr., Bd. XIV, H. 8.) Verdienste erworben.

Native Präparate werden im Dunkelfeld untersucht. Ausstriche werden mit Alkohol fixiert, (a) nach Giemsa gefärbt (1 Tropfen Stammlösung auf 1 ccm Aqua destillata) 2 Stunden 56° C; kurze Tannindifferenzierung; Wasser; trocknen; einschließen. (b) Zu 5 ccm^3 konz. wässeriger Alaunlösung kommen 5 ccm^3: Zinc. sulfur. 1,0, Tannin 10,0, Aqua dest. 100 und schließlich 3 ccm^3 konz. alkohol. Gentianaviolettlösung; mehrfaches Erwärmen bis zum Aufsteigen von Dämpfen; abwaschen; trocknen; einschließen. (c) Beizen der Ausstriche unter mehrfachen Erwärmen mit 5 ccm^3 kalt gesättigter, einige Tage gestandener Ferrosulfatlösung + 10 ccm^3 20 % Tanninlösung. Abspülen im scharfen Wasserstrahl; färben nach Löffler (s. 31) mit Anilinwasserfuchsin über der Flamme 3—5mal, abspülen, trocknen. Falls überfärbt wurde, Differenzierung mit Essigsäure (Acid. acet. conc. 1 Teil und 300 Teil Aqua dest.) $^1/_2$—1 Minute. Schnitte werden nach der Methode von Levaditi oder Yamamoto fixiert und behandelt (s. 47).

VII. Geflügelpocke. Epitheliom der Tauben und Hühner.

Darstellung der Körperchen mittels der Ultrafiltration (s. 76), Färbung nach Löffler (s. 31) oder Thionin; mit Giemsas Eosinazur (s. 43, 34).

Schnellfärbung mit Eisenhämatoxylin; nach Levaditi Versilberung (s. 47), Hämatoxylin-Sudan; oder nach Apolant-Ehrlich (Virchow's Archiv, 1903) Fixierung in Alkohol oder Carnoy's Alkohol-Chloroform-Essigsäure-Gemisch; Schnitte auf einige Minuten in konz. wässerige Irisaminlösung; Wasser; Nachfärbung in

[illegible] (G) [illegible]

[illegible] Influ[illegible] [illegible] ([illegible])

Tried these 3 [illegible] of Lepschutz on Strongly [illegible] on 8.3.22. [illegible] my [illegible]

Result (a) Green = poor result v. few "tot" stained.

(b) = Good result in as much as 'tots' are stained but much defaced of ground [illegible]

(c) ditto.

My NaOH method (viz. Fix in [illegible] Warming in 1% NaOH till steam arises, wash off, stain in [illegible] heating till steam arises, wash off [illegible]) gave better result than the above methods. The tots were stained; and the preparation was clear of ground (MHG)

[illegible]

einer nicht zu dünnen Methylgrünlösung 10 Sekunden; Wasser; in Lävulose einschließen oder wasserfreier Äther, Bergamottöl und Kanadabalsam. Benda färbt mit Gentiana-Vesuvin.

VIII. Epitheliom der Barben.

Lit.: G. Keysselitz, Archiv f. Protistenkunde, 1908. Fixierung der Stücke nach Flemming (s. 24). Färbung mit Ehrlichs Hämatoxylin oder Breinl-Hartmanns Eisenhämatoxylin.

IX. Virus myxomatosum der Kaninchen.

Lit.: Splendore (Zent. f. Bakt., XLVIII Bd., 1909, S. 301). Passiert nicht Chamberlandkerzen. In den großen Konjunktivazellen trachomkörperähnliche Einschlüsse; Zellen gebläht; Körnchen sehr fein. Einschluß, nach Giemsa verschwommen färbbar.

Die Frage bezüglich des Virus des Scharlachs, Masern und Maul- und Klauenseuche ist noch nicht spruchreif — die im ersteren Falle vorhandenen Mallory'schen Körperchen färbt man nach Mann oder Mallory sowie nach den bei „Variola und Vaccine" angegebenen Methoden. Ultrafiltration und Affenexperimente stets zu empfehlen.

Register.

Alga Caragaheen 71.
Agar zur Verlangsamung der Bewegung 72.
Ammoniakwasser 65.
Amöben 20.
Anopheles 55 ff.
Auffrischen der Ciliatenkulturen 71.
Auramin 16.
Ausstrichpräparate 51.

Berlinerblaumethode 20.
Bismarckbraun 13.
Borrels Gemisch 79.
Brillantkresylblau 14, 32.

Chromatin 18 ff.
Ciliata 70.
Cyanin 17.

Deckglasdicke 13.
Deckglasausstrich 33.
Dimethylamidoazolbenzol 16.
Dunkelfeldapparate 10, 11.
Dysenterieamöben 26.

Einbetten in Zentrifugenröhrchen 25.
Eisenchlorid 75.
Eisenhämatoxylin nach Heidenhain 25.
Eisenhämatoxylin n. Rosenbusch-Hartmann 26, 34.

Fanggläser 56.
Färbetrog nach Mayer 53.
Färbung nach Breinl, Rosenbusch und Hartmann 26, 34.
Färbung mit Anilinfarben nach Rawitz-Schuberg 78.
Filtration d. Vaccine 76 ff.
Fixierung mit Osmiumdämpfen 40.
Flagellaten 30 ff.
Flemmings Lösung 24.
— (stark) 29, 62.
Foraminiferen 28.

Geißelbeize nach Löffler 31, 39, 75.
Gelatine 18.
Gelbsucht 82.
Gemisch vom Rath 74.
Giemsa's Eosinazur 33, 39, 44, 54.
Giemsas Färbemethode (nasse Fixierung) 34.
Giesons Färbung 67.
Gregarinen 64.
Grenachers Hämatoxylin 24, 27, 63.

Heidenhains Eisenhämatoxylin 25.
Hemmung der Bewegung der Protozoen 71 ff.
Hermannsche Flüssigkeit 54, 62.
Holzessig 68.
Hühnerpest 82.

Immersionsöl 7.
Impfen der Kornea mit Vaccine 77.

Kala-azar 61.
Kaliumbichromatessigsäure nach Tellyesniczky 67.
Kaliumkarbonatlösung 33.
Kammer, Fechte nach Schulze 12.
Karbolthionin 69.
Kirschgummilösung 21.

Bunge's Mordant
(for flagella)

} Bowhill's Bact Technic
Edinburgh 1899
p 44

Ferric Chloride B.P. 1:20 aq Water 25cc

Saturated aqueous solution Tannin 75cc

(Bunge adds H_2O_2 to the above, but
Gunther denies value of this)

Klatschmethode 78.
Koccidien 62.
Kongorot 16.
Kultur von Amöben 21 ff.
Kulturen von Ciliaten 70.
Kultur der Spirochäten 42.
Kultur von Treponema 49.
Kultur von Trypanosomen 36, 37.

Lähmung d. Protozoen 23
Levaditi - Pyridinmethode 46 ff.
Lichtschutzkappe nach Mayer 9.
Löfflers Geißelfärbung 31, 39, 75.
Lugolsche Lösung 80.

Malaria 50 ff.
Mallory-Färbung 68.
Mannsche Färbung 79.
Mansons Methylenblau 52.
Markierapparat 12.
Methylenblau 14.
Methylgrünessigsäure 19.
Methylorange 16.
Mikroskop 7.
Mikroskopierlampe 9.
Molluscum contagiosum 83.
Müllersche Flüssigkeit 69, 27.
Myxosporidien 65.

Neutralrot 14, 26, 39.
Neutralviolett 16.
Nilblausulfat 16.

Orthsche Gemisch 67.

Paramaecienkulturen nach Hertwig 70.
Pebrine 66.
Perényische Flüssigkeit 69, 73, 28.
Pikrinessigsäure 73, 29.
Piroplasmen 60.
Plastin 19.
Polfäden der Myxosporidien 65 ff.

Radiolaria 29 ff.
v. Rathsche Gemisch 74
Romanowsky-Färbung 52 ff.
Ross-Methode 35, 54.

Sarkosporidien 68.
Saponin 33
Schnittfärbung für Spirochäten 46 ff.
Schusterkugel 9.
Spirochäteufärbung nach Nikiforoff und Löffler 41.
Spirochätenkultur 42.
Sublimatgemisch 24, 26, 28, 39, 62

Taurocholsaures Natrium 19.
Tellyesniczkys Gemisch 67.
Tollwut 79.
Trachom 81.
Treponema 43 ff.
— Kultur 49.
Tropäolin 16.
Trypanosomen 32 ff.
Tusche 17.
Tuscheverfahren nach Buri 50.

Ultrafiltration 77, 82, 83.

Vaccine 76 ff.
Variola 76.
Verdauen 19.
Vitalfarbstoffe 13.

Weidenreich-Hoffmann Osmiumfixierung 40

Yamamoto - Schnittfärbung 47 ff.

Zenkersche Flüssigkeit 25, 27.

DIEUDONNÉ, Prof. Dr. A., Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie. Zusammenfassende Übersicht über die Immunitätslehre. 6. umgearbeitete Auflage. VII, 240 S. 1909. M. 6.80, geb. M. 7.80.

Münchener Medizinische Wochenschrift: Es ist ein großer Vorzug des „Dieudonné" vor manchen anderen Lehrbüchern der Immunitätsforschung, daß seine Leser auch in bezug auf die Ausgestaltung der modernen Immunitätsforschung im Laufenden erhalten werden. Zu einer wirklich sachgemäßen Auswahl des schwierigen Stoffes ist allerdings nur ein Autor befähigt, der, wie gerade Dieudonné, die Entwickelung der Immunitätsforschung gründlich mit durchlebt hat und selbst inmitten ihrer Weiterentwickelung steht. Er besonders war befugt, Wichtiges aus dem gewaltigen Material herauszugreifen. Kurz, der „Dieudonné" ist dasjenige weit verbreitete literarische Hilfsmittel, welches man als geradezu unentbehrlich bezeichnen kann. Folgt dieses Buch doch wegen des raschen Neuerscheinens seiner Auflagen, welche der erfahrene Herausgeber dem jeweiligen neuesten Stande der Wissenschaft geschickt anzupassen versteht, der rapiden Entwickelung der Immunitätsforschung am besten.

Handbuch der Tropenkrankheiten. Unter Mitwirkung von Prof. Dr. A. Baelz (Tokio), Prof. Dr. P. W. Basset-Smith (Haslar), Dr. P. van Brero (Lawang) usw., herausgegeben von Dr. Carl Mense (Cassel). 3 Bände. Mit 565 Abbildungen im Text und auf 40 schwarzen und farbigen Tafeln. 1905/06. M. 56.—, geb. M. 60.50.

Literarisches Zentralblatt: Keine Nation kann diesem Sammelwerk ein gleich bedeutendes an die Seite setzen, das auf alle einschlägigen Fragen in wahrhaft mustergültiger Form Antwort gibt.

Deutsche Medizinische Wochenschrift: Die Ausstattung des Buches ist so vortrefflich wie die der früheren Bände. So ist denn das groß angelegte Werk, das den augenblicklichen Stand unserer Kenntnisse von den Tropenkrankheiten in Darstellungen von Autoren, die an der Erforschung der betreffenden Krankheiten hervorragenden Anteil genommen haben, wiedergibt, vollendet und wird voraussichtlich für eine geraume Zeit ein „standard work" in der internationalen Literatur auf dem Gebiete der Tropenmedizin bilden, und der verdienstvolle Herausgeber ist zu ihrem Gelingen zu beglückwünschen.

DÖNITZ, W., Die wirtschaftlich wichtigen Zecken, mit besonderer Berücksichtigung Afrikas VIII, 127 S. mit 38 Abbildungen auf 6 Tafeln. 1907. M. 5 —, geb. M. 5.80.

Wiener Klinische Wochenschrift: Das Buch besitzt alle Vorzüge eines klar geschriebenen Werkes, das den Zweck verfolgt, nicht nur dem Fachmanne zu dienen, sondern auch jenem Teile der Mediziner, die diesem wichtigen Gebiete Interesse entgegenbringen.

[illegible] P 34
P 26
Sublimat alcohol 26/27 39 62

Marine Stain for
Negri Corpuscles
in Lyssa P 79

Levaditi 47 Silver

Giemsa Composition 44.

Giemsa new stains
method for [illegible]
See P 34

[illegible] P 24

Loffler Flagella stain P 31

* Silver metal 46 48

SPAMERSCHE BUCHBINDEREI LEIPZIG